

NL



COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN

Brussel, 29 oktober 2003  
COM(2003) 644 definitief

2003/0256(COD)  
2003/0257(COD)

DEEL IV - Bijlage X, deel B, bij het  
voorstel voor een verordening

-

Voorstel voor een

**VERORDENING VAN HET EUROPEES PARLEMENT EN DE RAAD**

**inzake registratie, evaluatie en autorisatie van en beperkingen ten aanzien van chemische stoffen (Reach) en tot oprichting van een Europees Chemicaliënagentschap en wijziging van Richtlijn 1999/45/EG en Verordening (EG) {over persistente organische stoffen}**

Voorstel voor een

**RICHTLIJN VAN HET EUROPEES PARLEMENT EN DE RAAD**

**tot wijziging van Richtlijn 67/548/EEG van de Raad teneinde deze aan te passen aan Verordening (EG) nr. [...] van het Europees Parlement en de Raad inzake registratie, evaluatie en autorisatie van en beperkingen ten aanzien van chemische stoffen**

(ingediend door de Commissie)

{SEC(2003) 1171}

# „DEEL B: METHODEN VOOR DE BEPALING VAN DE TOXICITEIT EN ANDERE INVLOEDEN OP DE GEZONDHEID

## ALGEMENE INLEIDING: DEEL B

### B. ALGEMENE DEFINITIES VAN DE BEGRIPPEN DIE GEBRUIKT WORDEN BIJ DE TESTMETHODEN IN DEZE BIJLAGE

- i) **Acute toxiciteit** omvat de schadelijke effecten die binnen een gegeven tijd (meestal 14 dagen) na de toediening van een enkelvoudige dosis van een stof optreden.
- ii) **Manifeste toxiciteit** is een algemene term die duidelijke toxiciteitsverschijnselen beschrijft die optreden na de toediening van de teststof. Deze verschijnselen moeten een risicobepaling mogelijk maken en van een zodanige aard zijn dat verwacht mag worden dat bij een hogere toegediende dosis ernstige toxische verschijnselen en waarschijnlijk sterfte optreden.
- iii) **Dosis** is de toegediende hoeveelheid teststof. De dosis wordt uitgedrukt als gewicht (gram of milligram) of als het gewicht van de teststof per gewichtseenheid van het proefdier (bij voorbeeld mg per kg lichaamsgewicht) of als constante concentratie in het dieet (ppm, delen per miljoen of mg per kg voedsel).
- iv) **Discriminerende dosis** is het hoogste van de vier vaste dosisniveaus dat kan worden toegediend zonder dat met de teststof verband houdende sterfte wordt veroorzaakt (met inbegrip van de proefdieren die moeten worden afgemaakt).

- v) **Dosering** is een algemeen begrip dat de dosis, de frequentie en de duur van de toediening omvat.
- vi) **LD<sub>50</sub>** (letale-dosismediaan) is de statistisch vastgestelde enkelvoudige dosis van een stof waarvan kan worden verwacht dat bij 50 % van de dieren die de dosis hebben ontvangen de dood intreedt. De LD<sub>50</sub>-waarde wordt uitgedrukt in het gewicht van de teststof per gewichtseenheid proefdier (mg/kg).
- vii) **LC<sub>50</sub>** (letale-concentratie-mediaan) is de statistisch vastgestelde concentratie van een stof waarvan kan worden verwacht dat bij 50 % van de gedurende een bepaalde tijd blootgestelde dieren, tijdens de blootstelling of binnen een bepaalde tijd na de blootstelling de dood intreedt.  
  
De LC<sub>50</sub>-waarde wordt uitgedrukt in het gewicht van de teststof per standaardvolume lucht (mg/l).
- viii) **NOAEL** (No Observed Adverse Effect Level) is de afkorting voor de hoogste dosis of het hoogste niveau van blootstelling waarbij nog geen waarneembare toxiciteitsverschijnselen optreden die verband houden met de behandeling.
- ix) **Subchronische toxiciteit bij herhaalde dosis** omvat de schadelijke effecten die optreden bij proefdieren ten gevolge van herhaalde dagelijkse toediening van, of blootstelling aan een chemische stof gedurende een kort gedeelte van hun verwachte levensduur.
- x) **De maximale verdraagbare dosis (Maximum Tolerated Dose — MTD)** is het hoogste dosisniveau dat tekenen van toxiciteit bij proefdieren tot gevolg heeft zonder dat dit belangrijke gevolgen heeft voor de overleving in de test waarin ze wordt gebruikt.
- xi) **Huidirritatie** is het ontstaan van een ontstekingsreactie in de huid door het toedienen van een teststof op de huid.
- xii) **Oogirritatie** is het ontstaan van veranderingen in het oog door het toedienen van een teststof op het oppervlak aan de voorzijde van het oog.
- xiii) **Sensibilisatie van de huid** (allergische contactdermatitis) is een via het immuunsysteem veroorzaakte reactie van de huid op een stof.
- xiv) **Huidaantasting** is het optreden van irreversibele huidweefselbeschadiging na het toedienen van een teststof gedurende een periode van 3 minuten tot 4 uur.
- xv) **Toxicokinetica** is de bestudering van de absorptie, de distributie, het metabolisme en de excretie van teststoffen.
- xvi) **Absorptie** is het (geheel van) proces(sen) waardoor een toegediende stof het lichaam binnenkomt.
- xvii) **Excretie** is het (geheel van) proces(sen) waardoor de toegediende stof en/of de metabolieten daarvan door het lichaam worden uitgescheiden.
- xviii) **Distributie** is het (geheel van) proces(sen) waardoor de geabsorbeerde stof en/of de metabolieten daarvan over het lichaam worden verdeeld.
- xix) **Metabolisme** is het (geheel van) proces(sen) waardoor de toegediende stoffen in het lichaam chemisch worden veranderd door enzymatische of niet-enzymatische reacties.

#### **B.1 Acute toxiciteit, subchronische toxiciteit bij herhaalde dosis en chronische toxiciteit.**

De acute toxicologische effecten en de orgaan- of systeemtoxiciteit van een stof kunnen worden vastgesteld via een aantal toxiciteitstesten (methoden B.1-B.5) waarmee, na toediening van een enkele dosis, een eerste indicatie van de toxiciteit kan worden verkregen.

Afhankelijk van de toxiciteit van de stof kan worden overwogen een limietproef in plaats van een volledige LD<sub>50</sub> uit te voeren. Er is echter geen limietproef gespecificeerd bij inhalatieonderzoek omdat het niet mogelijk is gebleken om een ondubbelzinnige blootstellingslimiet bij inhalatie te definiëren.

Bij voorkeur moeten methoden worden toegepast waarbij zo weinig mogelijk proefdieren worden gebruikt en waarbij ongerief en pijn de proefdieren worden geminimaliseerd, bij voorbeeld door gebruik van de vastedosismethode (methode B.1 bis) en de bepaling van de acute-toxiciteitsklasse (methode B.1 ter). Bij proeven op het eerste niveau kunnen de resultaten van het eerste onderzoek worden aangevuld door onderzoek bij een tweede diersoort. In dit geval kan een standaard-testmethode worden gebruikt of kan de methode worden aangepast voor een kleiner aantal proefdieren.

De toxiciteitstest door herhaalde toediening (methoden B.7, B.8 en B.9) omvat de evaluatie van toxische effecten die het gevolg zijn van herhaalde blootstelling. Van groot belang is nauwkeurige klinische observatie van de proefdieren om zoveel mogelijk informatie te verkrijgen. Door deze proeven moet het mogelijk worden om de toxicologische doelwitorganen alsmede de toxische en niet-toxische doses te bepalen. Verder gedetailleerd onderzoek van deze aspecten kan nodig zijn in onderzoek op langere termijn (methoden B.26-B.30 en B.33).

## B.II Mutageniteit — Genotoxiciteit

Mutageniteit heeft betrekking op het veroorzaken van permanente erfelijke veranderingen in de hoeveelheid of de structuur van het erfelijk materiaal van cellen of organismen. Deze veranderingen (mutaties) kunnen een enkel gen of gensegment, een genenblok of één of meer volledige chromosomen betreffen. De chromosomale effecten kunnen van structurele en/of numerieke aard zijn.

De mutagene activiteit van een stof wordt in vitro vastgesteld voor puntmutaties bij bacteriën (methoden B.13/14) en/of voor structurele chromosoomafwijkingen bij zoogdiercellen (methode B.10).

Ook in vivo procedures, zoals de micronucleustest (methode B.12) of de metafaseanalyse bij beenmergcellen (methode B.11) zijn aanvaardbaar. Bij afwezigheid van contra-indicaties hebben de in vitro methoden echter verre de voorkeur.

Voor hogere produktievolumes en/of met het oog op de uitvoering of nadere uitwerking van een risicobeoordeling, kunnen aanvullende onderzoeken van de mutageniteit en pre-screening op carcinogeniteit nodig zijn. Deze kunnen voor een aantal doelen worden gebruikt: om resultaten van de basistests te bevestigen, om parameters te evalueren die niet in de basistests zijn onderzocht en om in vivo onderzoek op te zetten of uit te breiden.

Hiertoe omvatten de methoden B.15 tot B.25 zowel in vivo als in vitro eukaryotische systemen en een uitgebreide reeks biologische parameters („end-points”). Deze proeven geven informatie over puntmutaties en andere parameters in organismen die complexer zijn dan de bacteriën die in de basistests worden gebruikt.

Als een programma van verder mutageniteitsonderzoek wordt overwogen, moet de opzet in principe zodanig zijn dat relevante aanvullende informatie over de mogelijke mutagene en/of carcinogene eigenschappen van de stof wordt verkregen.

Welk onderzoek in een bepaald geval geschikt is hangt af van een groot aantal factoren zoals: de chemische en fysische eigenschappen van de stof, de resultaten van voorafgaand bacteriologisch en cytogenetisch onderzoek, het metabolisch profiel van de stof, de resultaten van andere toxiciteitsonderzoeken en de toepassingen van de stof voor zover deze bekend zijn. In het licht van de verscheidenheid van factoren die eventueel nader onderzoek verdienen, is het niet gewenst om ten aanzien van de aard van de uitgevoerde proeven strikte regels vast te stellen.

In Richtlijn 93/67/EEG is een aantal algemene beginselen vastgelegd. Duidelijke teststrategieën kunnen worden gevonden in de technische leidraad met betrekking tot risicobepaling; die is echter flexibel en kan naar behoefte worden aangepast aan specifieke omstandigheden.

Hieronder zijn methoden voor verder onderzoek opgesomd op basis van het voornaamste genetische criterium.

### *Onderzoek op gen(punt)mutaties*

- a) Vooruit- of terugmutatieonderzoek waarbij eukaryotische micro-organismen (*Saccharomyces cerevisiae*) worden gebruikt (methode B.15)
- b) In vitro onderzoek op vooruitmutaties bij zoogdiercellen (methode B.17)
- c) Bepaling van recessief-letale mutaties van geslachtsgebonden genen bij *Drosophila melanogaster* (methode B.20)
- d) In vivo bepaling van somatische mutaties, vlekentest op muizen (methode B.24)

### *Onderzoek op chromosoomafwijkingen*

- a) In vivo cytogenetische tests op zoogdieren; in vivo metafaseanalyse van beenmergcellen kan worden overwogen als dit niet bij het eerste onderzoek is gedaan (methode B.11). Verder kan in vivo cytogenetisch onderzoek worden verricht op geslachtscellen (methode B.23)
- b) In vitro cytogenetische tests op zoogdiercellen als dit niet bij het eerste onderzoek is gedaan (methode B.10)
- c) Onderzoek op dominant-letale mutaties bij knaagdieren (methode B.22)
- d) Onderzoek op erfelijke translocaties bij muizen (methode B.25)

## *Genotoxische effecten — effecten op DNA*

Genotoxiciteit, waaronder wordt verstaan de mogelijk schadelijke effecten op genetisch materiaal die niet direct geassocieerd zijn met mutageniteit, kan worden aangetoond als schade aan het DNA zonder directe tekenen van mutatie. De volgende methoden, die gebruik maken van eukaryotische micro-organismen of zoogdiercellen, kunnen voor dergelijk onderzoek worden gebruikt:

- a) Mitotische recombinatie bij *Saccharomyces cerevisiae* (methode B.16)
- b) DNA-beschadiging en -herstel — DNA-herstelsynthese — zoogdiercellen in vitro (methode B.18)
- c) Zusterchromatidenuitwisseling bij zoogdiercellen in vitro (methode B.19)

### *Alternatieve methoden voor onderzoek naar mogelijke carcinogeniteit*

Er zijn transformatietests voor zoogdiercellen beschikbaar die het vermogen meten van een stof om in celculturen morfologische en gedragsveranderingen te veroorzaken die waarschijnlijk samenhangen met kwaadaardige veranderingen in vivo (methode B.21). Er kunnen verschillende celtypes en verschillende transformatiecriteria worden gebruikt.

### *Risicobeoordeling van erfelijke effecten bij zoogdieren*

Er bestaan methoden voor het meten van erfelijke effecten bij zoogdieren die worden veroorzaakt door gen(punt)mutaties, bij voorbeeld de specifieke-locustest bij muizen, voor het meten van geslachtscelmutaties bij de eerste generatie (niet in deze bijlage opgenomen), en voor chromosoomafwijkingen, bij voorbeeld de test op erfelijke translocatie bij muizen (methode B.25). Dergelijke methoden kunnen worden gebruikt bij het evalueren van het genetisch risico van een stof voor de mens. Gezien de complexiteit van deze onderzoeken en het zeer grote aantal benodigde proefdieren, zeker bij de specifieke-locustest, zijn echter goede redenen nodig om deze uit te voeren.

## **B.III Carcinogeniteit**

Chemische stoffen kunnen, afhankelijk van het veronderstelde werkingsmechanisme, worden getypeerd als wel- of niet-genotoxische carcinogenen.

Het onderzoek op mutageniteit/genotoxiciteit kan reeds informatie over het genotoxisch-carcinogene vermogen van een stof opleveren nog vóór een screening wordt uitgevoerd. Aanvullende informatie kan worden verkregen uit subchronische of chronische toxiciteitstest waarbij herhaalde doses worden toegediend. De toxiciteitstest met herhaalde toediening, methode B.7 en onderzoeken met langer herhaalde doses omvatten de bepaling van histopathologische veranderingen, bij voorbeeld hyperplasie in bepaalde weefsels, die een aanwijzing kunnen vormen. Deze onderzoeken en toxicologische gegevens kunnen bijdragen tot het identificeren van stoffen met mogelijke carcinogeniteit, waarna dit aspect eventueel grondiger moet worden onderzocht via een carcinogeniteitstest (methode B.32) of vaak ook een gecombineerd onderzoek op chronische toxiciteit en carcinogeniteit (methode B.33).

## **B.IV Reproductietoxiciteit**

Reproductietoxiciteit kan op verschillende manieren worden vastgesteld, bij voorbeeld door verslechtering van de mannelijke en vrouwelijke voortplantingsfuncties of -capaciteit, „effecten op de vruchtbaarheid” genoemd. Dit laatste aspect omvat ook teratogeniteit en effecten die optreden tijdens de lactatie.

Bij onderzoek op teratogeniteit, als onderdeel van onderzoek op ontwikkelingstoxiciteit, is de onderzoeksmethode (methode B.31) voornamelijk gericht op toediening via orale weg. Als alternatief kunnen ook andere wegen gekozen worden, afhankelijk van de fysische eigenschappen van de te onderzoeken teststof of de waarschijnlijke wijze van blootstelling bij de mens. In zulke gevallen moet de methode op een passende manier gewijzigd worden met inachtneming van de relevante elementen van de 28-daagse testmethode.

Als een voortplantings(vruchtbaarheids)onderzoek over drie generaties nodig is kan de beschreven methode voor voortplantingsonderzoek over twee generaties (methode B.35) tot drie generaties worden verlengd.

## **B.V Neurotoxiciteit**

Neurotoxiciteit kan op verschillende manieren worden vastgesteld, bij voorbeeld door functionele veranderingen en/of structurele en biochemische veranderingen in het centrale of het perifere zenuwstelsel. Een eerste indicatie van neurotoxiciteit kan worden verkregen uit onderzoek naar acute toxiciteit. De toxiciteitstest met herhaalde toediening (methode B.7) houdt ook het vaststellen van neurotoxicologische effecten in, en de nadruk moet worden gelegd op nauwkeurige klinische waarnemingen om zoveel mogelijk informatie te verkrijgen. De methode moet het mogelijk maken om stoffen te identificeren die een neurotoxische werking kunnen hebben, waarna verder, diepgaand onderzoek naar dit aspect nodig kan zijn. Verder is het van belang om rekening te houden met de mogelijkheid dat stoffen een specifieke neurotoxische werking kunnen hebben die met ander toxiciteitsonderzoek niet ontdekt kan worden. Bij bepaalde organische fosforverbindingen is bij voorbeeld een vertraagde neurotoxische werking ontdekt die vastgesteld kan worden met de methoden B.37 en B.38 na enkelvoudige of herhaalde blootstelling.

## B.VI Immunotoxiciteit

Immunotoxiciteit kan op verschillende manieren worden vastgesteld, bij voorbeeld door immunsuppressie en/of verhoging van de gevoeligheid van het immuunsysteem welke hypersensitiviteit of geïnduceerde auto-immuniteit tot gevolg heeft. De toxiciteitstest met herhaalde toediening (methode B.7) houdt onder meer het vaststellen van immunotoxische effecten in. De methode moet het mogelijk maken stoffen te identificeren die een immunotoxische werking kunnen hebben, waarna verder, diepgaand onderzoek naar dit aspect nodig kan zijn.

## B.VII Toxicokinetica

Toxicokinetisch onderzoek is een ondersteuning bij de interpretatie en evaluatie van toxiciteitsgegevens. Dit onderzoek dient om te werpen op bepaalde aspecten van de toxiciteit van de onderzochte stoffen en de resultaten kunnen worden gebruikt bij het opzetten van voortgezet toxiciteitsonderzoek. Het is niet de bedoeling dat in alle gevallen alle parameters worden bepaald. Zelden zal de gehele reeks toxicokinetische onderzoeken (absorptie, excretie, distributie en metabolisme) nodig zijn. Bij bepaalde verbindingen kan een andere volgorde de voorkeur verdienen, of kan worden volstaan met een onderzoek waarbij één enkele dosis wordt toegediend (methode B.36).

Informatie over de chemische structuur (SAR) en fysisch-chemische eigenschappen kan ook een indicatie geven over de absorptiekenmerken langs de voorgestelde toedieningsweg en over de te verwachten metabolische reacties en de verdeling over de weefsels. Over de toxicokinetische parameters kan ook informatie beschikbaar zijn door voorafgaand toxiciteitsonderzoek en toxicokinetisch onderzoek.

## C. KARAKTERISERING VAN DE TESTSTOF

De samenstelling van de teststof, met inbegrip van de voornaamste verontreinigingen, en de relevante fysisch-chemische eigenschappen, waaronder de stabiliteit, moeten vóór de aanvang van ieder toxiciteitsonderzoek bekend zijn.

De fysisch-chemische eigenschappen van de teststof leveren belangrijke informatie over de keuze van de manier van toedienen, de opzet van ieder afzonderlijk onderzoek en het hanteren en bewaren van de teststof.

Alvorens het onderzoek wordt aangevat, moet een analytische methode voor de kwalitatieve en kwantitatieve bepaling van de teststof (zo mogelijk met inbegrip van de voornaamste verontreinigingen) in het toedieningsmedium en in het biologisch materiaal ontwikkeld worden.

Alle gegevens met betrekking tot de identificatie, de fysisch-chemische eigenschappen, de zuiverheid en het gedrag van de teststof moeten in het onderzoeksrapport worden opgenomen.

## D. VERZORGING VAN DE DIEREN

Bij toxiciteitstests zijn een stringente bewaking van de levensomstandigheden en een goede verzorging van de dieren een eerste vereiste.

### i) Huisvesting

De leefomstandigheden in de kamers of ruimten waar de proefdieren zijn ondergebracht, moeten geschikt zijn voor het soort proefdier. Voor ratten, muizen en cavia's is een kamertemperatuur van  $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  en een relatieve luchtvochtigheid van 30-70 % geschikt; voor konijnen moet de temperatuur  $20\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  en de relatieve luchtvochtigheid 30-70 % bedragen.

Sommige experimentele technieken zijn bijzonder gevoelig voor temperatuuffecten; in dergelijke gevallen wordt in de beschrijving van de onderzoeksmethode nader ingegaan op de correcte proefomstandigheden. Bij ieder onderzoek naar toxische effecten moeten de temperatuur en de vochtigheidsgraad worden gecontroleerd, opgetekend en in het eindverslag van de studie worden opgenomen.

Er moet gebruik worden gemaakt van kunstlicht met afwisselend twaalf uur licht — twaalf uur duisternis. Nadere gegevens over de verlichting moeten worden opgetekend en in het eindverslag worden opgenomen.

Tenzij anders bij de methode vermeld, worden de dieren hetzij afzonderlijk, hetzij in kleine groepen van hetzelfde geslacht gehuisvest. In het laatste geval mogen per kooi niet meer dan vijf dieren worden gehuisvest.

Het is belangrijk om in verslagen over dierproeven steeds te vermelden welk soort kooien is gebruikt en hoeveel dieren tijdens de blootstelling aan de chemische stof en tijdens latere waarnemingsperiodes in iedere kooi waren gehuisvest.

### ii) Voeding

Bij de samenstelling van het voedsel moet worden voldaan aan alle eisen die de proefdiersoorten aan hun voeding stellen. Indien chemische stoffen via de voeding aan de dieren worden toegediend, kan de voedingswaarde door interactie tussen de stof en een bestanddeel van de voeding verminderd worden. Bij het interpreteren van de resultaten dient rekening te worden gehouden met de mogelijkheid van dergelijke reacties. Er kan gebruik worden gemaakt van gebruikelijk laboratoriumvoeder met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater. De keuze van het voedsel kan mede worden bepaald door de noodzaak de teststof, wanneer die via het voedsel wordt toegediend, op een passende wijze daarmee te vermengen.

Onzuiverheden in de voeding waarvan bekend is dat ze de toxiciteit beïnvloeden, mogen niet in werkzame concentraties voorkomen.

## E. WELZIJN VAN DE DIEREN

Bij het uitwerken van de testmethoden werd extra aandacht besteed aan dierenwelzijn. Enkele voorbeelden worden hieronder samengevat, maar deze lijst is niet volledig. De exacte formulering en/of voorwaarden dienen te worden nagelezen in de tekst van de methoden:

- Voor de bepaling van de acute orale toxiciteit moeten twee alternatieve methoden, de „vastedosismethode” en de „bepaling van de acute-toxiciteitsklasse” worden overwogen. Bij de eerste methode wordt niet uitgegaan van de dood als specifiek criterium en bij deze methode worden minder proefdieren gebruikt. Bij de tweede methode wordt gemiddeld 70 % minder proefdieren gebruikt dan bij methode B.1 ter bepaling van de acute orale toxiciteit. Beide alternatieve methoden veroorzaken minder ongerief en pijn dan de klassieke methode.
- Het aantal proefdieren is teruggebracht tot het wetenschappelijk aanvaardbare minimum: slechts vijf proefdieren van hetzelfde geslacht worden per dosisniveau getest voor de methoden B.1 en B.3; slechts tien dieren (en maar vijf voor de negatieve controlegroep) worden gebruikt voor de bepaling van de sensibilisering van de huid door de maximalisatietest voor cavia's (methode B.6); het aantal dieren dat benodigd is voor de positieve controle bij het testen van de mutageniteit in vivo wordt ook verminderd (methoden B.11 en B.12).
- Ongerief en pijn van de dieren tijdens de proef worden tot een minimum teruggebracht; het kan nodig zijn dieren die ernstige, blijvende verschijnselen van lijden en pijn vertonen op humane wijze af te maken; het doseren van teststoffen volgens een methode waarvan bekend is dat zij veel lijden en pijn veroorzaken wegens de corrosieve of irriterende eigenschappen van de stof, is niet vereist (methoden B.1, B.2 en B.3).
- Het testen met irrelevant hoge doses wordt vermeden door het invoeren van limietproeven, niet alleen bij de tests op acute toxiciteit (methoden B.1, B.2 en B.3) maar ook bij de in vivo tests op mutageniteit (methoden B.11 en B.12).
- Een strategie voor irritatietests maakt het thans mogelijk een test achterwege te laten of de studie te beperken tot een enkel dier wanneer voldoende wetenschappelijke gegevens voorhanden zijn.

Deze wetenschappelijke gegevens kunnen worden gebaseerd op de fysisch-chemische eigenschappen van de stof, de resultaten van andere reeds uitgevoerde proeven of de resultaten van goed gevalideerde in vitro proeven. Indien bij voorbeeld bij het uitvoeren van een onderzoek naar acute toxiciteit bij toediening via de huid geen huidirritatie werd waargenomen bij de limietdosis van de te onderzoeken stof (methode B.3), kan verder testen op huidirritatie (methode B.4) overbodig zijn; stoffen die duidelijk bijtende of ernstige huidirriterende eigenschappen vertonen bij het onderzoek naar huidirritatie (methode B.4), dienen niet verder te worden getest op oogirritatie (methode B.5).

## F. ALTERNATIEVE TESTEN

Een wetenschappelijke doelstelling van de Europese Unie is het ontwikkelen en valideren van alternatieve technieken die dezelfde hoeveelheid informatie opleveren als de huidige dierproeven, maar waarbij minder proefdieren worden gebruikt, die minder lijden veroorzaken of die het gebruik van dieren volledig overbodig maken.

Naarmate dergelijke methoden ter beschikking komen, moet het gebruik ervan waar mogelijk worden overwogen voor de risicobeoordeling en de daaruit voortvloeiende classificatie en etikettering ten aanzien van de intrinsieke risico's.

## G. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Bij de evaluatie en interpretatie van de testresultaten moet rekening worden gehouden met de beperkingen ten aanzien van de mate waarin de resultaten van dierproeven en in vitro tests kunnen worden geëxtrapolerd naar de mens. Daarom kunnen aanwijzingen voor schadelijke effecten bij de mens, indien beschikbaar, gebruikt worden als bevestiging van de testresultaten.

Deze resultaten kunnen worden gebruikt voor de classificatie en etikettering van nieuwe en bestaande chemische stoffen met betrekking tot hun effecten op de menselijke gezondheid op basis van de intrinsieke eigenschappen die met deze methoden geïdentificeerd en gekwantificeerd worden. De criteria voor classificatie en etikettering in de desbetreffende bijlage IV hebben mede betrekking op de „end-points” van de testprotocollen die bij deze testmethoden horen.

Deze resultaten kunnen ook worden gebruikt voor onderzoek gericht op de risicobeoordeling van nieuwe en bestaande chemische stoffen. De voor deze doeleinden gepaste teststrategieën zijn aangegeven in de desbetreffende documenten met richtsnoeren.

## H. LITERATUUR

De meeste van deze methoden zijn ontwikkeld binnen het kader van het OESO-programma inzake richtsnoeren voor het testen; zij moeten worden toegepast overeenkomstig de beginselen van „goede laboratoriumpraktijken”, om zoveel mogelijk te komen tot „onderlinge acceptatie van gegevens”.

Verdere informatie kan worden gevonden in de referenties die te vinden zijn in de OESO-richtsnoeren en in relevante literatuur die elders is gepubliceerd.”



## B.1 bis. ACUTE ORALE TOXICITEIT — VASTE-DOSISMETHODE

### 1. METHODE

#### 1.1. INLEIDING

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

#### 1.2. DEFINITIES

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

#### 1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

#### 1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De acute orale toxiciteitstest verstrekt gegevens over de nadelige effecten die, binnen korte tijd, op het innemen van een enkele dosis van de teststof kunnen volgen.

De vaste-dosismethode wordt in twee fasen uitgevoerd.

In een voorstudie worden de effecten van verschillende oraal, met een maagsonde, toegediende doses op dieren van één geslacht sequentiëel onderzocht. Deze voorstudie verstrekt informatie over de relatie tussen dosis en toxiciteit, alsmede een schatting van de minimale letale dosis. Gewoonlijk worden in deze fase niet meer dan 5 dieren onderzocht.

Gedurende het hoofdonderzoek wordt de stof op één van de vooraf bepaalde dosisniveaus (5, 50, 500 of 2 000 mg/kg) oraal, met behulp van een maagsonde, aan groepen van 5 mannetjes en 5 wijfjes toegediend. De gebruikte dosis wordt in de voorstudie bepaald en is de dosis waarvan verwacht wordt dat die „evidente intoxicatie” veroorzaakt (zie 1.2. Definities), maar geen sterfte.

Na de toediening worden waarnemingen van de effecten gedaan.

Wanneer het eerst gekozen dosisniveau duidelijke intoxicatie veroorzaakt, maar geen met de teststof verband houdende mortaliteit, is het niet nodig de proef voort te zetten.

Wanneer op het gekozen dosisniveau geen evidente intoxicatie wordt waargenomen, dient de stof op het volgende hogere dosisniveau te worden getest. Wanneer dieren sterven of wanneer een ernstige toxische reactie het noodzakelijk maakt dieren op een humane wijze te doden, dient de stof bij het naast gelegen lagere dosisniveau te worden getest.

Deze procedure maakt de identificatie mogelijk van de „discriminerende dosis” (zie 1.2. Definities), dat wil zeggen het hoogste van de vooraf vastgestelde niveaus van de doses die kunnen worden toegediend zonder sterfte te veroorzaken (inclusief het pijnloos doden van proefdieren).

Dieren die verschijnselen van ernstige en aanhoudende angst en pijn vertonen, mogen op een humane wijze gedood worden. Het doseren van teststoffen op een wijze waarvan bekend is dat het als gevolg van corrosieve of irriterende eigenschappen duidelijke ernstige nood en pijn veroorzaakt, behoeft niet te worden uitgevoerd.

#### 1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

#### 1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

##### 1.6.1. Voorbereidingen

##### 1.6.1.1. Proefdieren

Tenzij er contra-indicaties zijn, wordt de voorkeur gegeven aan ratten.

De proef dient te worden uitgevoerd met een rattenstam die gewoonlijk in laboratoria wordt gebruikt. Voor ieder geslacht mag het gewicht van de dieren die bij de test worden gebruikt, niet meer dan  $\pm 20\%$  van het gemiddelde gewicht afwijken.

Vóór de test worden de dieren ten minste vijf dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden als van de proef gehouden. Voor de test worden gezonde, jonge volwassen dieren steekproefsgewijs geselecteerd en in de behandelingsgroepen van de voorstudie en het hoofdonderzoek ingedeeld. In de praktijk zal voor het hoofdonderzoek, slechts één groep van elk geslacht nodig zijn.

#### 1.6.1.2. *Dosisbereiding en -toediening*

Zo nodig wordt de teststof in een geschikt medium opgelost of gesuspenderd. Het verdient aanbeveling om eerst gebruik te maken van een oplossing in water. Als dat niet mogelijk is kan achtereenvolgens plantaardige olie of een ander middel worden overwogen als oplosmiddel of om de stof in te suspenderen. Van niet-waterige media moeten de toxische eigenschappen bekend zijn; als dit niet het geval is moeten deze eigenschappen vóór of tijdens de test worden vastgesteld. Bij knaagdieren mag het maximale volume dat voor de proef wordt gebruikt normaliter niet groter zijn dan 10 ml/kg lichaamsgewicht, behalve bij oplossingen in water waarvan het voor de proef gebruikte volume maximaal 20 ml/kg mag bedragen. De spreiding in het volume moet zo klein mogelijk worden gehouden door de concentratie zodanig aan te passen dat bij alle dosisniveaus een constant volume wordt gewaarborgd.

Vóór de toediening van de teststof dient aan de dieren voeding te worden onthouden. Aan ratten wordt in de nacht vóór de test geen voedsel verstrekt; water is niet aan beperkingen onderworpen. De volgende dag dienen de dieren te worden gewogen. Vervolgens wordt de teststof in één enkele dosis per maagsonde toegediend. Als het niet mogelijk is de teststof in één enkele dosis toe te dienen, kan deze in kleinere porties, verdeeld gedurende een periode van ten hoogste 24 uur, worden gegeven. Nadat de teststof is toegediend, kunnen de dieren nog drie of vier uur zonder voedsel worden gelaten. Als een dosis in kleinere porties verdeeld over een bepaalde periode wordt toegediend, kan het nodig zijn de dieren, afhankelijk van de lengte van die periode, van voedsel en water te voorzien.

#### 1.6.2. *Uitvoering*

##### 1.6.2.1. *Voorstudie*

De effecten van verschillende doses worden op individuele dieren onderzocht. Hiervoor gebruikt men normaliter wijfjes, tenzij er aanduidingen zijn dat mannetjes gevoeliger zijn. De doses worden sequentieel toegediend, dat wil zeggen de tijd tussen toediening van de dosis aan een volgend dier dient ten minste 24 uur te zijn. Bij alle dieren wordt zorgvuldig gelet op tekenen van toxiciteit, gedurende een periode van ten minste zeven dagen. Wanneer tekenen van matige toxiciteit na zeven dagen aanwezig blijven, dient het dier gedurende een verdere periode van zeven dagen te worden geobserveerd. De volgende dosisniveaus kunnen worden toegepast: 5, 50, 500 en 2 000 mg/kg. Wanneer de eerste gekozen dosis geen ernstige toxiciteit veroorzaakt, en de volgende hogere dosis sterfte veroorzaakt, kan het nodig zijn één of meer tussen gelegen dosisniveaus te onderzoeken. Hiermee moet het mogelijk zijn informatie te verzamelen over het (de) dosisniveau(s) die tekenen van toxiciteit veroorzaakt (veroorzaken) evenals over het laagste dosisniveau dat mortaliteit veroorzaakt.

Gestreefd dient te worden naar het selecteren van het eerste dosisniveau aan de hand van kennis over verwante chemische stoffen. Wanneer deze informatie ontbreekt, wordt aanbevolen 500 mg/kg als eerste dosis te gebruiken. Wanneer geen tekenen van toxiciteit bij het eerste dosisniveau waargenomen worden, kan het volgende hogere dosisniveau onderzocht worden. Wanneer geen mortaliteit bij 2 000 mg/kg optreedt, is het vooronderzoek beëindigd en zal het hoofdonderzoek bij dat dosisniveau moeten worden gestart. Wanneer de dieren op humane wijze gedood moeten worden, als gevolg van ernstige effecten die door het eerste dosisniveau (bij voorbeeld 500 mg/kg) veroorzaakt worden, dient het naast gelegen lagere dosisniveau (bij voorbeeld 50 mg/kg) aan een ander dier te worden toegediend. Wanneer dit dier blijft leven, kunnen tussenliggende dosisniveaus aan andere dieren worden toegediend. Gewoonlijk worden niet meer dan vijf dieren in deze procedure gebruikt.

##### 1.6.2.2. *Hoofdonderzoek*

Voor ieder te onderzoeken dosisniveau dienen tien dieren (vijf wijfjes en vijf mannetjes) te worden gebruikt. De wijfjes moeten nullipaar zijn en niet zwanger.

Een principieel onderdeel van de vaste-dosismethode is dat alleen matig toxische doses worden gebruikt. Het toedienen van dodelijke doses van de teststof moet worden vermeden.

Het bij de proef te gebruiken dosisniveau dient te worden geselecteerd uit vier vaste-dosisniveaus, te weten 5, 50, 500 of 2 000 mg/kg lichaamsgewicht. Het eerste dosisniveau dat gekozen wordt, is het niveau waarvan verwacht wordt dat het evidente intoxicatie veroorzaakt, maar geen met de teststof verband houdende

mortaliteit (inclusief het noodzakelijk geworden humane doden; toevallige sterfgevallen tellen niet mee maar dienen wel te worden geregistreerd). Wanneer dit dosisniveau evidente intoxicatie veroorzaakt, maar geen met de teststof verband houdende mortaliteit, is verder testen niet nodig.

Wanneer als gevolg van de toediening van het geselecteerde dosisniveau geen evidente intoxicatie optreedt, dient de stof opnieuw te worden getest op het volgende hogere dosisniveau. De dieren moeten echter onder observatie worden gehouden tot de observatieperiode is afgelopen. Wanneer dieren humaan moeten worden gedood in verband met een ernstige toxische reactie, of bij mortaliteit, die verband houdt met de teststof, dient de stof op het naast gelegen lagere dosisniveau te worden getest. Ook nu dienen dieren, die niet behoeven te worden gedood, de volledige observatieperiode onder observatie te worden gehouden.

Na de toediening worden waarnemingen gedaan. Deze worden systematisch geregistreerd. Dit dient voor ieder dier afzonderlijk te geschieden.

De observatieperiode moet minstens 14 dagen duren. De duur van de observatie kan echter niet dwingend worden voorgeschreven. Zij is afhankelijk van de toxische reacties, de snelheid waarmee deze ontstaan en de duur van het herstel; de periode kan dus zo nodig worden verlengd. Van belang is het tijdstip waarop de intoxicatieverschijnselen voor het eerst worden waargenomen en weer verdwijnen, alsmede het tijdstip waarop de dood intreedt, vooral wanneer de mogelijkheid bestaat dat de intoxicatieverschijnselen pas laat zichtbaar worden.

Er dient een zorgvuldig klinisch onderzoek plaats te vinden en wel twee keer op de dag van het toedienen van de dosis en minstens één keer per dag daarna. Dieren die duidelijk pijn lijden of ernstige tekenen van angst vertonen dienen humaan te worden gedood. De eerste dagen na het toedienen van de testdosis zijn aanvullende waarnemingen noodzakelijk indien de dieren tekenen van intoxicatie blijven vertonen. De proef kan worden beëindigd indien het duidelijk wordt dat het gekozen dosisniveau te hoog was.

Er dient gelet te worden op veranderingen van huid en vacht, ogen en slijmvliezen, ademhaling, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedragspatroon. Bijzondere aandacht dient te worden besteed aan de waarneming van tremoren, convulsies, speekselvloed, diarree, lethargie, slaap en coma.

Het gewicht van elk individueel dier dient te worden vastgesteld kort voordat de teststof wordt toegediend, vervolgens dagelijks de daarop volgende drie dagen en daarna wekelijks. De dieren die tijdens de proef sterven en zij die tot het einde van de proef in leven blijven worden gewogen. Vervolgens wordt op hen necropsie verricht. Alle macroscopische waarneembare pathologische veranderingen dienen te worden geregistreerd. Als hiertoe aanleiding bestaat, dient weefsel verzameld te worden voor histopathologisch onderzoek.

Het onderzoek van een tweede of, in uitzonderlijke gevallen, van een derde dosisniveau kan, afhankelijk van de resultaten van het voorafgaande dosisniveau, noodzakelijk zijn.

Wanneer een stof mortaliteit veroorzaakt bij 5 mg/kg lichaamsgewicht (of wanneer de voorstudie aangeeft dat bij dat dosisniveau mortaliteit op zal treden), kan nader onderzoek naar de acute toxiciteit van de stof plaatsvinden.

## 2. GEGEVENS

Gegevens uit zowel de voorstudie als het hoofdonderzoek dienen voor elk getest dosisniveau in tabellen te worden samengevat, waarin is weergegeven: het aantal dieren aan het begin van de test, het aantal dieren dat intoxicatieverschijnselen vertoont, het aantal dieren dat tijdens de test is gestorven of humaan moest worden gedood, een beschrijving van de toxische effecten en, voor het hoofdonderzoek, vermelding of evidente intoxicatie welke verband houdt met de teststof is waargenomen, het verloop in de tijd van eventuele toxische effecten en de bevindingen bij de necropsie. Veranderingen in het gewicht van de dieren die langer dan één dag in leven blijven, worden berekend en genoteerd.

Dieren die humaan moeten worden gedood vanwege ernstige angst en pijn, welke verband houdt met de teststof, worden geregistreerd als dieren die door de teststof zijn gestorven.

## 3. RAPPORTAGE

### 3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In dit verslag dienen, voor zover mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen voor zowel de voorstudie als het hoofdonderzoek:

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voeding, enz.;
- proefomstandigheden;

- dosisniveaus (met het eventuele medium en de concentratie);
- volledige resultaten van alle onderzochte dosisniveaus;
- tabellarische gegevens betreffende de effecten naar geslacht en dosisniveau (dat wil zeggen aantal gebruikte dieren, veranderingen in lichaamsgewicht, eventueel aantal dieren dat tijdens de proef is gestorven of moest worden gedood, aantal dieren dat intoxicatieverschijnselen vertoont, aard, ernst en duur van de effecten);
- tijdverloop van de eerste tekenen van intoxicatie en eventuele reversibiliteit van deze effecten;
- wanneer dieren gestorven of gedood zijn, het tijdstip van sterven na de toediening van de stof, alsmede redenen en criteria voor het humaan doden van dieren;
- necropsiebevindingen;
- eventuele histopathologische bevindingen;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten, met inbegrip van de verschijnselen van evidente intoxicatie en het bij de proef vastgestelde discriminerende dosisniveau.

### 3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

DOSIS	RESULTATEN	INTERPRETATIE
5 mg/kg lichaamsgewicht	Minder dan 100 % overlevende dieren	Teststoffen die ZEER TOXISCH zijn
	100 % overlevende dieren doch evidente intoxicatie Teststoffen die TOXISCH zijn	
50 mg/kg lichaamsgewicht	100 % overlevende diere geen evidente intoxicatie	Zie resultaten bij 50 mg/kg
	Minder dan 100 % overlevende dieren	Teststoffen die mogelijk TOXISCH of ZEER TOXISCH zijn. Zie resultaten bij 5 mg/kg
	100 % overlevende dieren doch evidente intoxicatie	Teststoffen die SCHADELIJK zijn
500 mg/kg lichaamsgewicht	100 % overlevende dieren, geen evidente intoxicatie Zie resultaten bij 500 mg/kg	
	Minder dan 100 % overlevende dieren	Teststoffen die mogelijk TOXISCH of SCHADELIJK zijn. Zie resultaten bij 50 mg/kg
	100 % overlevende dieren doch evidente intoxicatie	Teststoffen die geacht worden geen significante acute toxiciteit te bezitten
2 000 mg/kg lichaamsgewicht	100 % overlevende dieren, geen evidente intoxicatie Zie resultaten bij 2 000 mg/kg	
	Minder dan 100 % overlevende dieren	Zie resultaten bij 500 mg/kg
	100 % overlevende dieren met of zonder evidente intoxicatie	Teststoffen zonder significante acute toxiciteit

Zie ook algemene inleiding deel B (D).

### 4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (E).

## B.1ter ACUTE ORALE TOXICITEIT — METHODE TER BEPALING VAN DE ACUTE-TOXICITEITSKLASSE

### 1. METHODE

#### 1.1. Inleiding

De methode ter bepaling van de acute-toxiciteitsklasse geeft informatie ten behoeve van zowel risicobeoordeling als risicoclassificatie.

Bij de methode worden drie vaste doses gebruikt die voldoende ver uit elkaar liggen om een stof in te kunnen delen met behulp van de resultaten van het onderzoek. Verder kunnen in de door deze testmethode beschreven procedure nog drie aanvullende vaste doses gekozen worden die gebruikt kunnen worden als alternatieve opties op gegeven beslispunten of als opties voor verdere proeven. Het gebruik van (een of meer) aanvullende doses kan overwogen worden als een verdere verfijning wenselijk of noodzakelijk is.

Bij de methode wordt gebruik gemaakt van drie vastgestelde begindoses. Het is niet de bedoeling om een exacte  $LD_{50}$  te berekenen maar om een blootstellingsbereik te bepalen waarbij mortaliteit kan worden verwacht, daar de dood van een aantal proefdieren nog steeds het hoofdcriterium van deze test is. De resultaten van deze test moeten volgens de criteria van bijlage IV geïnterpreteerd kunnen worden. Ten gevolge van de sequentiële aanpak kan de duur van de test langer zijn dan die van de in B.1 beschreven procedure. Het grote voordeel van deze methode is dat een kleiner aantal proefdieren nodig is dan in de acute-toxiciteitstest (oraal) (B.1) en de alternatieve vastedosismethode (B.1bis).

Zie ook de algemene inleiding deel B.

#### 1.2. Definities

Zie algemene inleiding deel B.

#### 1.3. Principe van de testmethode

De stof wordt in een van de vastgestelde doses oraal toegediend aan een groep proefdieren. De stof wordt getest met behulp van een getrapte procedure waarbij bij iedere stap drie dieren van hetzelfde geslacht worden gebruikt. Het is niet nodig om een voorstudie te doen. Het al dan niet voorkomen van door de stof veroorzaakte mortaliteit bepaalt de volgende stap, d.w.z.:

- verder testen is niet nodig
- de volgende stap wordt uitgevoerd met dezelfde dosis, maar met dieren van het andere geslacht
- de volgende stap wordt uitgevoerd met de eerstvolgende hogere of de eerstvolgende lagere dosis

#### 1.4. Beschrijving van de testmethode

##### 1.4.1. Voorbereiding

Er wordt een aselechte steekproef samengesteld van gezonde jonge volwassen dieren. Deze worden gemerkt voor individuele herkenning en vóór het begin van de test ten minste vijf dagen in hun kooien gehouden ter acclimatisatie aan de laboratoriumomstandigheden. Dieren van hetzelfde geslacht die dezelfde dosis krijgen, mogen in één kooi worden ondergebracht maar het aantal dieren per kooi mag niet zo groot zijn dat duidelijke waarneming van ieder dier afzonderlijk belemmerd wordt.

De teststof wordt in een enkele dosis toegediend met behulp van een maagsonde of een geschikte intubatiecanule.

Zo nodig wordt de teststof in een geschikt vehiculum opgelost of gesuspenseerd. Het verdient aanbeveling om zo mogelijk gebruik te maken van een oplossing/suspensie in water. Als dat niet mogelijk is, kan naar olie (bij voorbeeld maïsolie) of in laatste instantie naar een ander vehiculum worden gegrepen. Van niet-waterige media moeten de toxicologische eigenschappen bekend zijn; als dat niet het geval is moeten deze eigenschappen vóór de test worden vastgesteld.

Voor het toedienen van de dosis dienen de proefdieren te vasten. Aan ratten wordt gedurende de voorafgaande nacht geen voedsel verstrekt, voor muizen geldt een periode van 3-4 uur. Water mag onbepakt worden gegeven.

#### 1.4.2. *Proefomstandigheden*

##### 1.4.2.1. Proefdieren

Tenzij er contra-indicaties zijn, wordt de voorkeur gegeven aan ratten. De wijfjes moeten nullipaar zijn en mogen niet zwanger zijn.

Bij het begin van de studie moet de gewichtsvariatie van de dieren minimaal zijn; het gewicht van ieder dier mag ten hoogste 20 % van het gemiddelde voor zijn geslacht afwijken.

##### 1.4.2.2. Aantal en geslacht

Voor iedere stap worden drie dieren van hetzelfde geslacht gebruikt. Voor de eerste stap mag het geslacht vrij worden gekozen.

##### 1.4.2.3. Dosisniveaus

Het initiële dosisniveau wordt gekozen uit één van drie vaste dosisniveaus, bij voorbeeld 25, 200 en 2 000 mg/kg lichaamsgewicht. De begindosis moet zo zijn, dat waarschijnlijk bij ten minste een aantal van de blootgestelde proefdieren mortaliteit optreedt. Afhankelijk van de begindosis wordt één van de in bijlage 1 opgenomen stroomschema's gevolgd.

Bij het kiezen van het geslacht en de begindosis moet alle beschikbare informatie gebruikt worden, met inbegrip van die over relaties tussen structuur en activiteit. Als op grond van die informatie vermoed wordt dat waarschijnlijk bij het hoogste dosisniveau (2 000 mg/kg lichaamsgewicht) geen mortaliteit zal optreden, moet een limiettest uitgevoerd worden. Als over een teststof geen informatie beschikbaar is, wordt met het oog op het welzijn van de proefdieren een startdosis van 200 mg/kg lichaamsgewicht aanbevolen.

Soms kan het wenselijk zijn de informatie meer te verfijnen dan met het uitvoeren van de proef met drie vaste dosisniveaus van 25, 200 en 2 000 mg/kg lichaamsgewicht mogelijk zou zijn. In die gevallen kan overwogen worden om verder te testen met bijkomende vaste dosisniveaus van 5, 50 of 500 mg/kg lichaamsgewicht.

Doses waarvan bekend is dat zij hevige pijn en ongemak veroorzaken door bijtende of sterk irriterende werking, behoeven niet te worden toegediend.

Het tijdsinterval tussen de blootstelling van de opeenvolgende groepen wordt bepaald door de aanvang, de duur en de hevigheid van de toxische verschijnselen. Blootstelling van proefdieren van het andere geslacht, of blootstelling aan een volgende dosis moet worden uitgesteld totdat men zeker is van het overleven van de proefdieren die de vorige dosis toegediend hebben gekregen.

##### 1.4.2.4. Limiettest

Een limiettest met een dosisniveau van 2 000 mg/kg lichaamsgewicht kan worden uitgevoerd met drie proefdieren van elk geslacht. Als mortaliteit optreedt ten gevolge van de toediening van de teststof kan het nodig zijn om verder te testen met een dosis van 200 of 500 mg/kg lichaamsgewicht.

##### 1.4.2.5. Observatieperiode

De proefdieren moeten doorgaans 14 dagen worden geobserveerd, behalve wanneer dieren uit het onderzoek moeten worden verwijderd en op humane wijze worden afgemaakt uit welzijnsoverwegingen of omdat zij dood worden aangetroffen. De duur van deze observatieperiode moet echter niet streng vastgelegd worden. Deze moet worden bepaald door de toxische reacties, het tijdstip waarop deze voor het eerst worden waargenomen en de duur van het herstel, en kan dus worden verlengd als dat nodig is. De tijdstippen waarop toxische verschijnselen merkbaar worden en weer verdwijnen zijn van belang, zeker als er een bepaalde tendens tot vertraagde toxiciteit wordt vastgesteld. Alle waarnemingen moeten systematisch worden geregistreerd, waarbij voor ieder dier een apart verslag wordt bijgehouden.

#### 1.4.3. *Procedure*

Na de periode van voedselonthouding moeten de dieren vóór de toediening van de teststof worden gewogen. Na toediening van de teststof kan nog gedurende 3-4 uur voedsel onthouden worden. Als een dosis in gedeelten over een langere tijd wordt toegediend kan het nodig zijn de dieren van voedsel en water te voorzien, afhankelijk van de duur van die periode.

Het maximale vlocistofvolume dat per keer kan worden toegediend hangt af van de grootte van de proefdieren. Bij knaagdieren mag het volume doorgaans niet meer kan 1 ml/100 g lichaamsgewicht bedragen; in het geval van waterige oplossingen kan echter 2 ml/100 g lichaamsgewicht aanvaardbaar zijn. Variaties in het testvolume moeten geminimaliseerd worden door het aanpassen van de concentratie zodat op alle dosisniveaus hetzelfde constante volume kan worden gebruikt. Als een enkelvoudige dosis niet mogelijk is, kan de dosis gedurende een periode van minder dan 24 uur in kleinere gedeelten worden toegediend.

Bijzonderheden van de testprocedure worden beschreven in bijlage 1.

#### 1.4.3.1. Algemene observaties

Op de dag van de toediening moeten minimaal tweemaal — en eventueel vaker, als de reactie van de dieren op de behandeling dat nodig maakt — nauwkeurige klinische observaties worden verricht, en vervolgens minstens één keer daags. Dieren die stervende zijn of dieren die hevige pijn lijden of persistente tekenen van ernstige nood vertonen moeten op humane wijze worden afgemaakt. Dieren die om ethische redenen zijn afgemaakt worden beschouwd als dieren die door de teststof zijn gestorven.

Als dieren om ethische redenen worden gedood of dood worden aangetroffen, moet het tijdstip hiervan zo nauwkeurig mogelijk worden genoteerd. Wanneer de dieren aanhoudende verschijnselen van toxiciteit vertonen moeten aanvullende waarnemingen worden verricht. Onder meer moet gelet worden op veranderingen in huid en vacht, ogen en slijmvliezen en ook bij de ademhaling, de bloedsomloop en het autonome en centrale zenuwstelsel alsmede de somatomotorische activiteit en het gedrag. Er moet gelet worden op bevingen, stuiptrekkingen, kwijlen, diarree, lethargie, slaap en coma.

Alle waarnemingen moeten systematisch worden geregistreerd, waarbij voor ieder dier een apart rapport wordt bijgehouden.

#### 1.4.3.2. Lichaamsgewicht

Elk dier moet kort voor de teststof wordt toegediend worden gewogen en daarna ten minste eenmaal per week. Veranderingen in gewicht moeten worden berekend en bijgehouden. Bij de beëindiging van de test moeten de overlevende dieren worden gewogen alvorens ze op humane wijze worden afgemaakt.

#### 1.4.3.3. Macroscopische necropsie

Op alle proefdieren, met inbegrip van de dieren die tijdens de test sterven of die uit de test worden verwijderd, moet een macroscopische necropsie worden uitgevoerd. Alle macroscopische pathologische veranderingen moeten voor elk proefdier worden vastgelegd. Als organen van proefdieren die 24 uur of meer in leven zijn gebleven, macroscopische pathologische veranderingen vertonen kan ook microscopische necropsie worden overwogen omdat dat bruikbare informatie kan opleveren.

### 2. GEGEVENS

Van ieder dier moeten individuele gegevens beschikbaar gemaakt worden. Verder moeten alle gegevens worden samengevat in tabellen waarbij voor iedere testgroep wordt geregistreerd: het gebruikte aantal proefdieren, het aantal dat tekenen van toxiciteit heeft vertoond, het aantal dieren dat tijdens de test is gestorven of om ethische redenen is afgemaakt, het tijdstip van sterven van ieder dier, een beschrijving en het verloop in de tijd van de toxische effecten (inclusief de eventuele reversibiliteit daarvan), en de resultaten van de necropsie.

Algemene richtsnoeren voor de interpretatie van de resultaten met het oog op de classificatie worden gegeven in bijlage 2.

### 3. RAPPORTAGE

#### Verslag van de proefnemingen

In dit verslag dienen, voor zover mogelijk, de volgende gegevens te worden opgenomen:

##### *Proefdieren:*

- diersoort, stam;
- microbiologische status van de dieren, indien bekend;
- aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;
- herkomst, behuizing, voeding enz.;
- het gewicht van elk dier afzonderlijk bij de aanvang van de test, wekelijks daarna en bij het einde van de test.

##### *Proefomstandigheden:*

- motivering van de keuze van het vehiculum als dit geen water is;
- bijzonderheden over de toediening van de teststof met inbegrip van de toegediende volumes en het tijdstip van toediening;
- bijzonderheden omtrent voedsel en water (met inbegrip van type en herkomst van het voedsel, waterbron);
- motivering van de keuze van de beginosis.

*Resultaten:*

- overzicht in tabelvorm van de gegevens met betrekking tot ieder dier, opgesplitst naar dosis en geslacht (het betreft de respons van de dieren die toxische verschijnselen, waaronder sterfte, vertoonden alsmede de aard, duur en hevigheid van de effecten);
- tijdsverloop van de eerste verschijnselen van intoxicatie en eventuele reversibiliteit van deze verschijnselen voor ieder dier afzonderlijk;
- resultaten van de necropsie en eventuele histopathologische bevindingen voor ieder dier afzonderlijk, indien beschikbaar.

*Bespreking van de resultaten.*

*Conclusies.*

4. **LITERATUUR**

Deze methode komt overeen met TG 423 van de OESO.

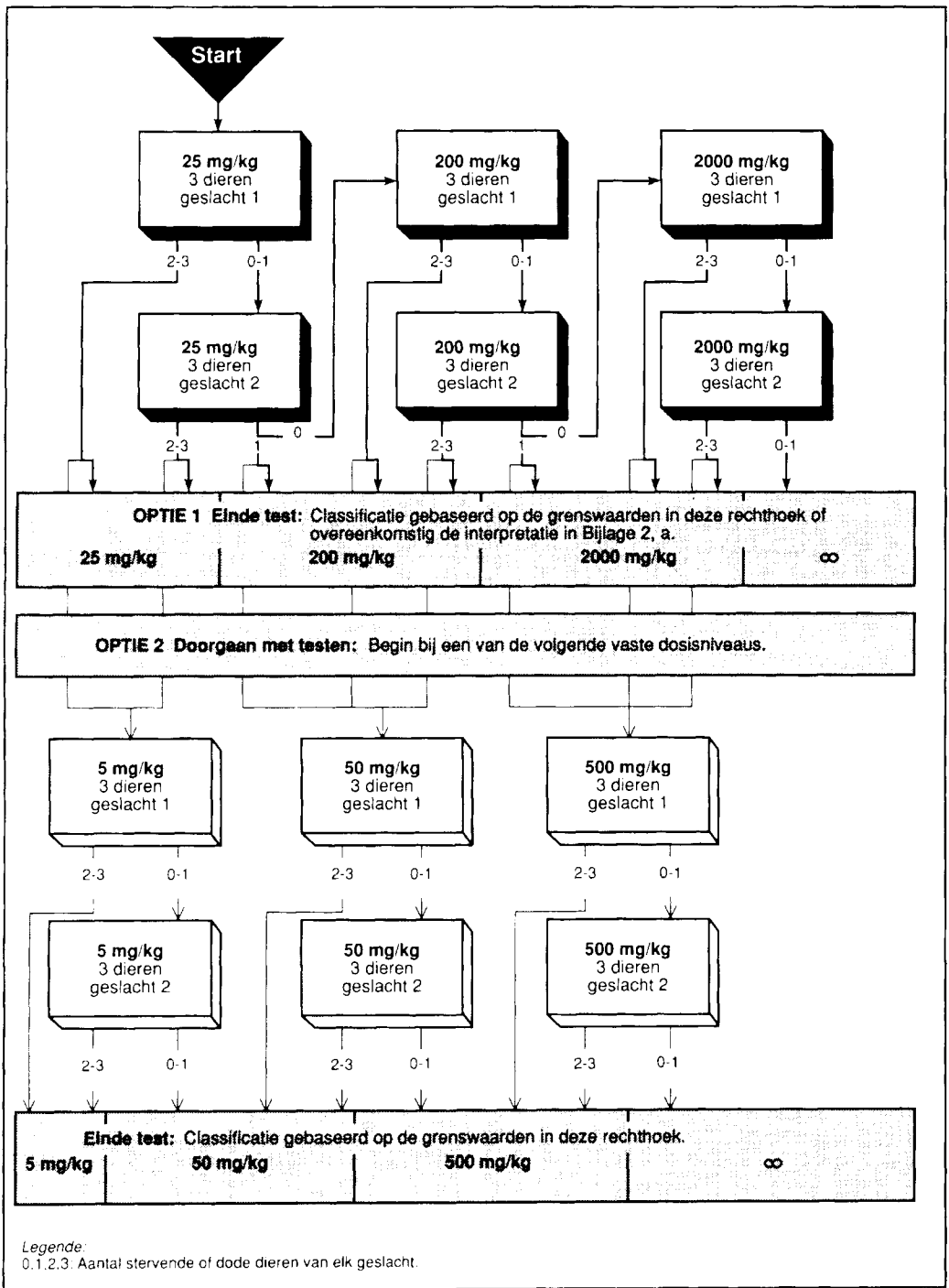
---



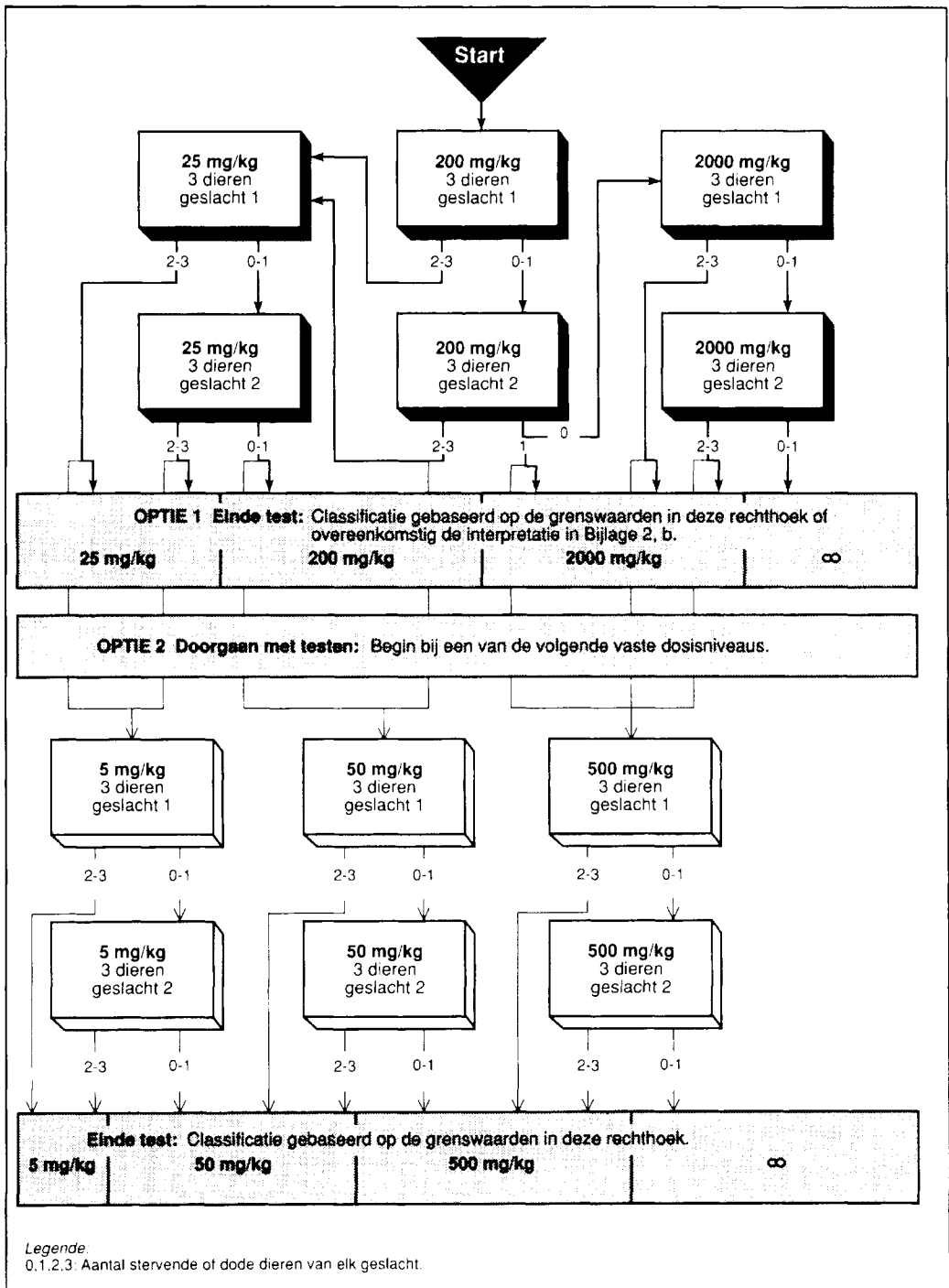
TESTPROCEDURE

1. Zoals vermeld in punt 1.4.2.3 moet de begindosis zó worden gekozen dat ten minste een gedeelte van de proefdieren sterft. De ter zake relevante informatie omvat onder meer:
  - gegevens over fysisch-chemische eigenschappen;
  - relaties tussen structuur en activiteit;
  - alle gegevens van andere toxiciteitstesten, en
  - het verwachte gebruik van de teststof.
2. Voor iedere begindosis geeft het bijbehorende testschema dat in deze bijlage is opgenomen, de te volgen procedure. Afhankelijk van het aantal gestorven of op humane wijze afgemaakte dieren volgt de testprocedure de aangegeven pijlen.
3. Indien bij een begindosis van 25 of 200 mg/kg lichaamsgewicht slechts één dier van het tweede geslacht sterft, leidt dit gewoonlijk tot niet verder testen. Als er echter geen toxische verschijnselen worden waargenomen bij de andere vijf dieren moet bij de autopsie aan de mogelijkheid gedacht worden dat de mortaliteit geen gevolg is van de teststof. In dat geval moet de test worden vervolgd met de eerstvolgende hogere dosis.
4. Indien bij een begindosis van 2000 mg/kg lichaamsgewicht slechts één dier per geslacht sterft is de verwachtingswaarde van de LD<sub>50</sub> meer dan 2000 mg/kg lichaamsgewicht. Omdat dit echter een grensgeval is moet de respons van de andere twee dieren per geslacht nauwkeurig worden onderzocht. Het optreden van duidelijke toxische verschijnselen bij deze dieren kan aanleiding zijn tot een classificatie die overeenkomt met een LD<sub>50</sub>-waarde van 2000 mg/kg lichaamsgewicht of minder, of tot verder testen op hetzelfde niveau.
5. De procedure kan het verder testen op drie vaste dosisniveaus inhouden (optie 2). Deze optie kan worden gebruikt voor het kiezen van een alternatieve dosis op een gegeven beslispunt, of voor verder testen nadat de lopende test is afgesloten (optie 1). Bij optie 1 is de testprocedure aangegeven met vette pijlen, bij optie 2 met dunne pijlen.

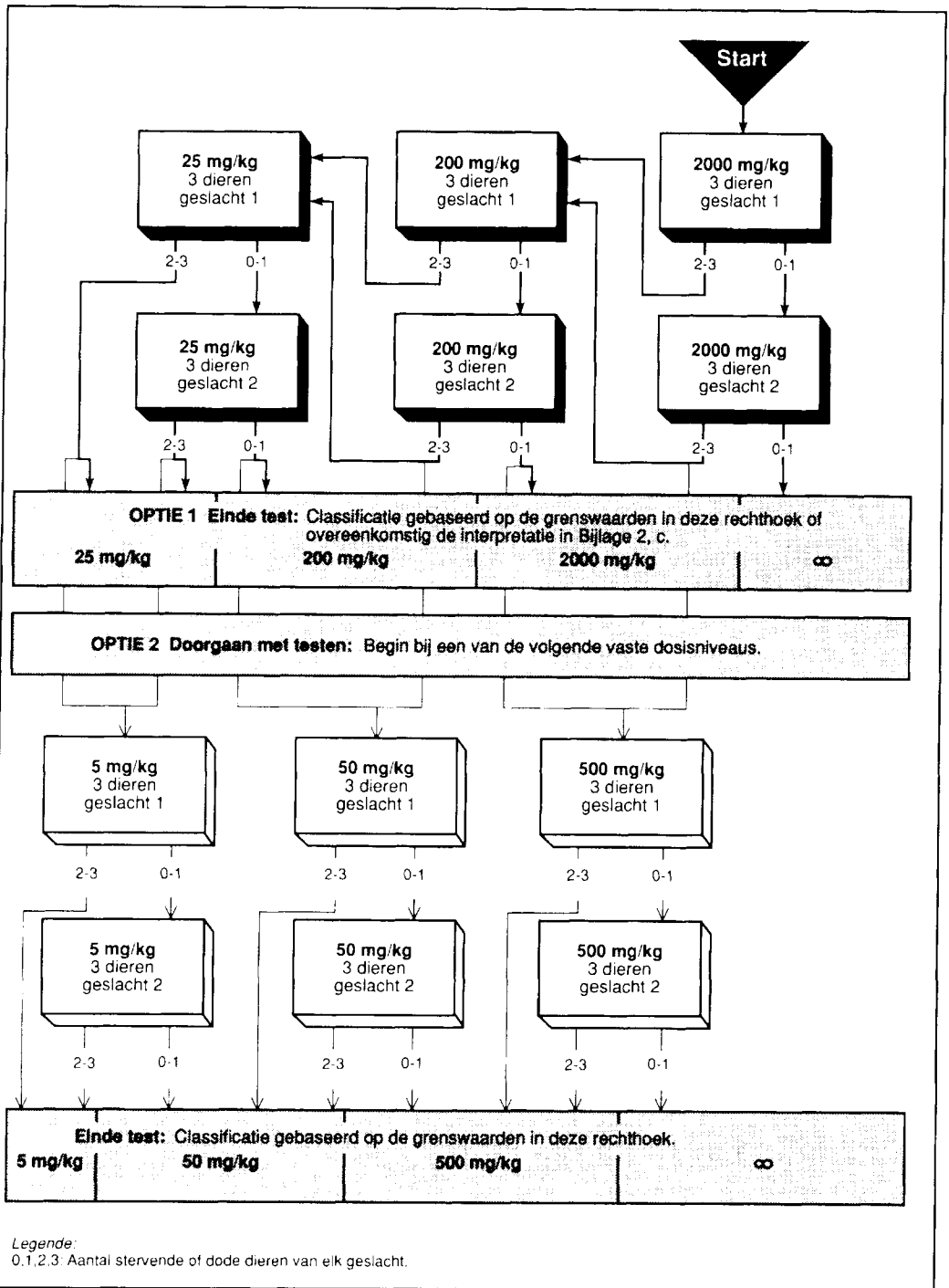
a) Testprocedure voor een beginosis van 25 mg/kg lichaamsgewicht



b) Testprocedure voor een begin dosis van 200 mg/kg lichaamsgewicht



c) Testprocedure voor een beginndosis van 2 000 mg/kg lichaamsgewicht

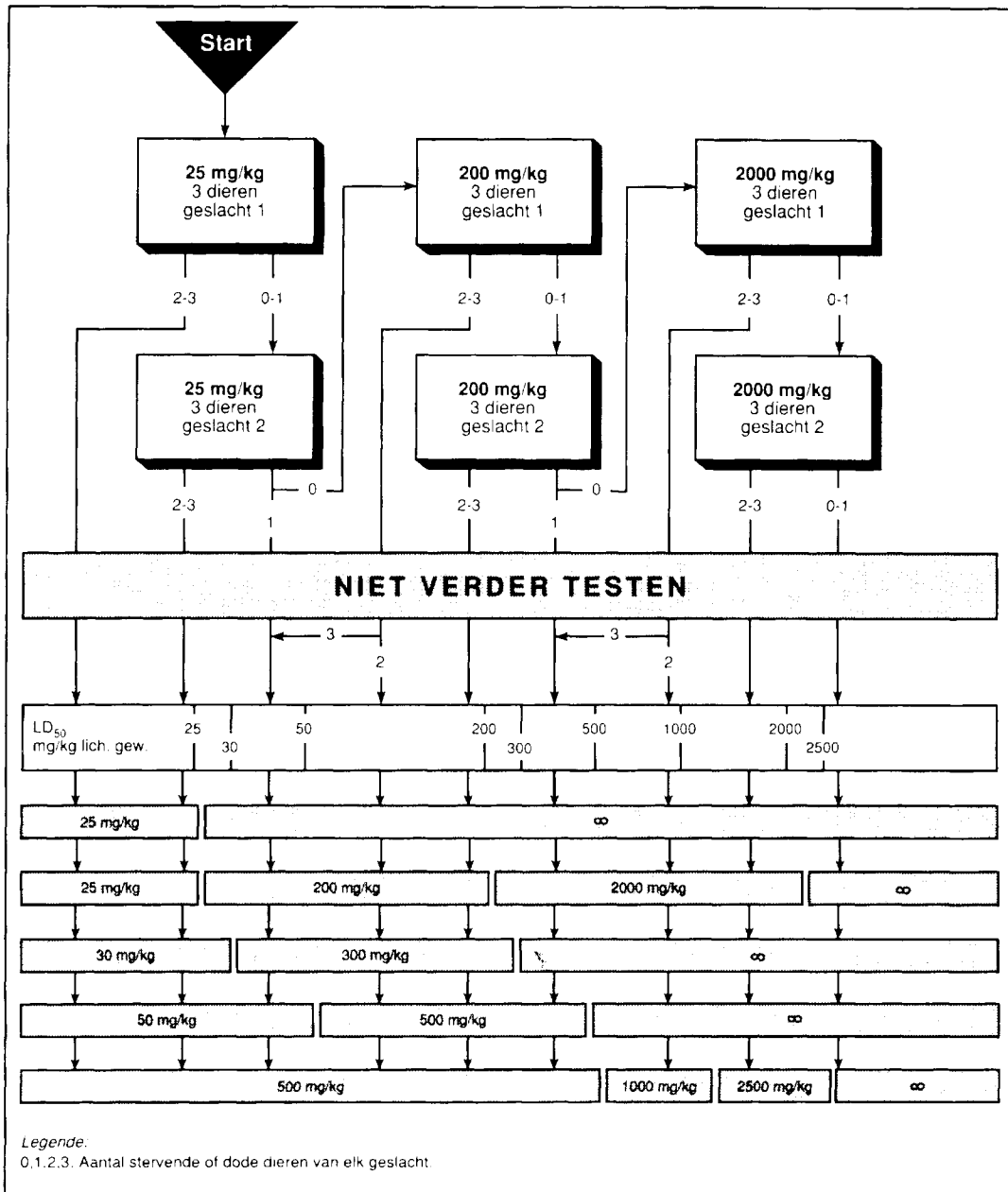


INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN BIJ HET TESTEN VOLGENS OPTIE 1

De grijze rechthoeken onder de rechthoek met „niet verder testen” in de schema's van deze bijlage geven de grenswaarden voor de classificatie weer. Bij het volgen van de testprocedure zoals aangeduid in optie 1, moet de juiste pijl verder naar beneden worden gevolgd tot deze de passende grijze rechthoek bereikt.

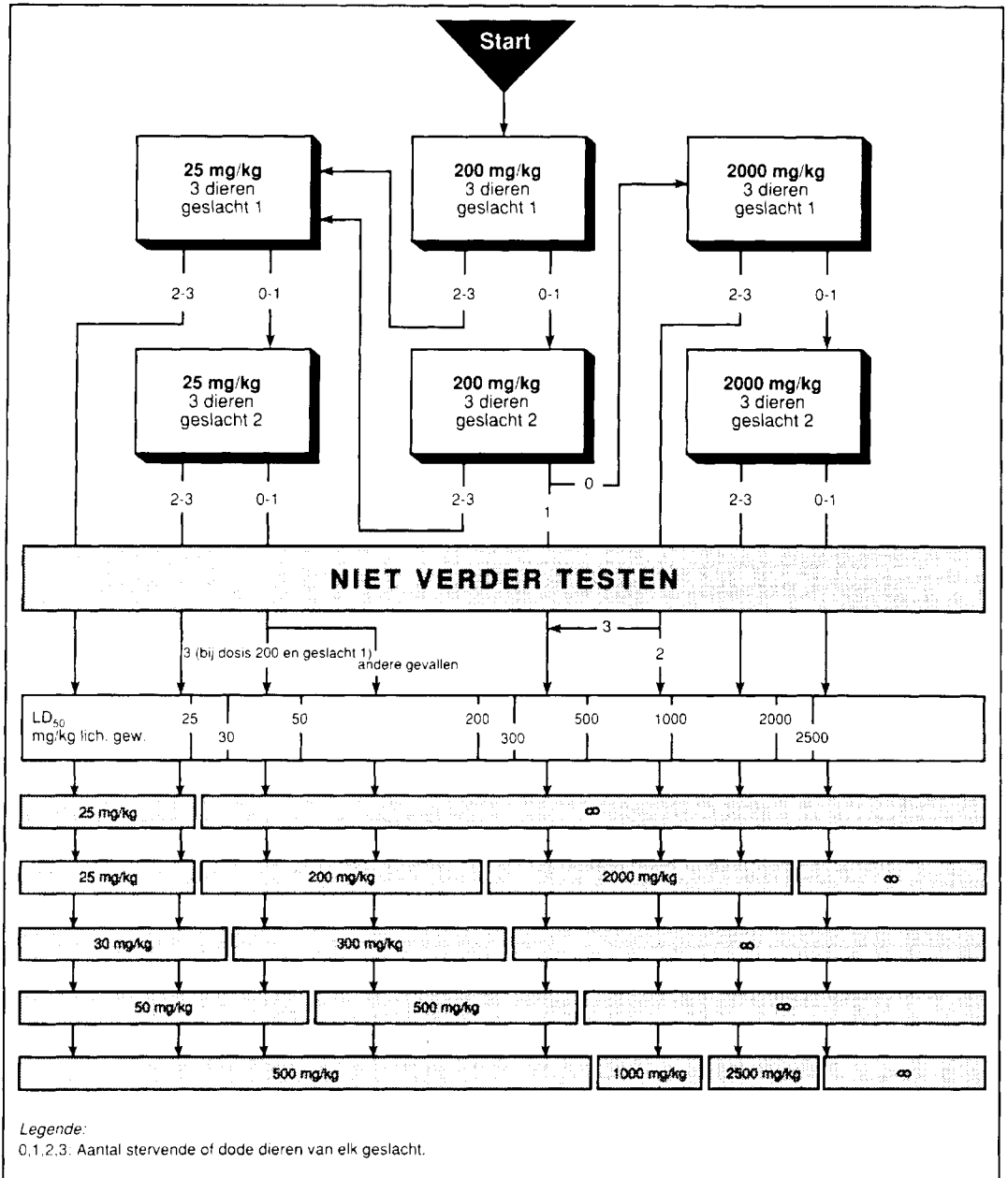
a) Interpretatie van de resultaten bij het testen volgens optie 1

Begin dosis: 25 mg/kg lichaamsgewicht



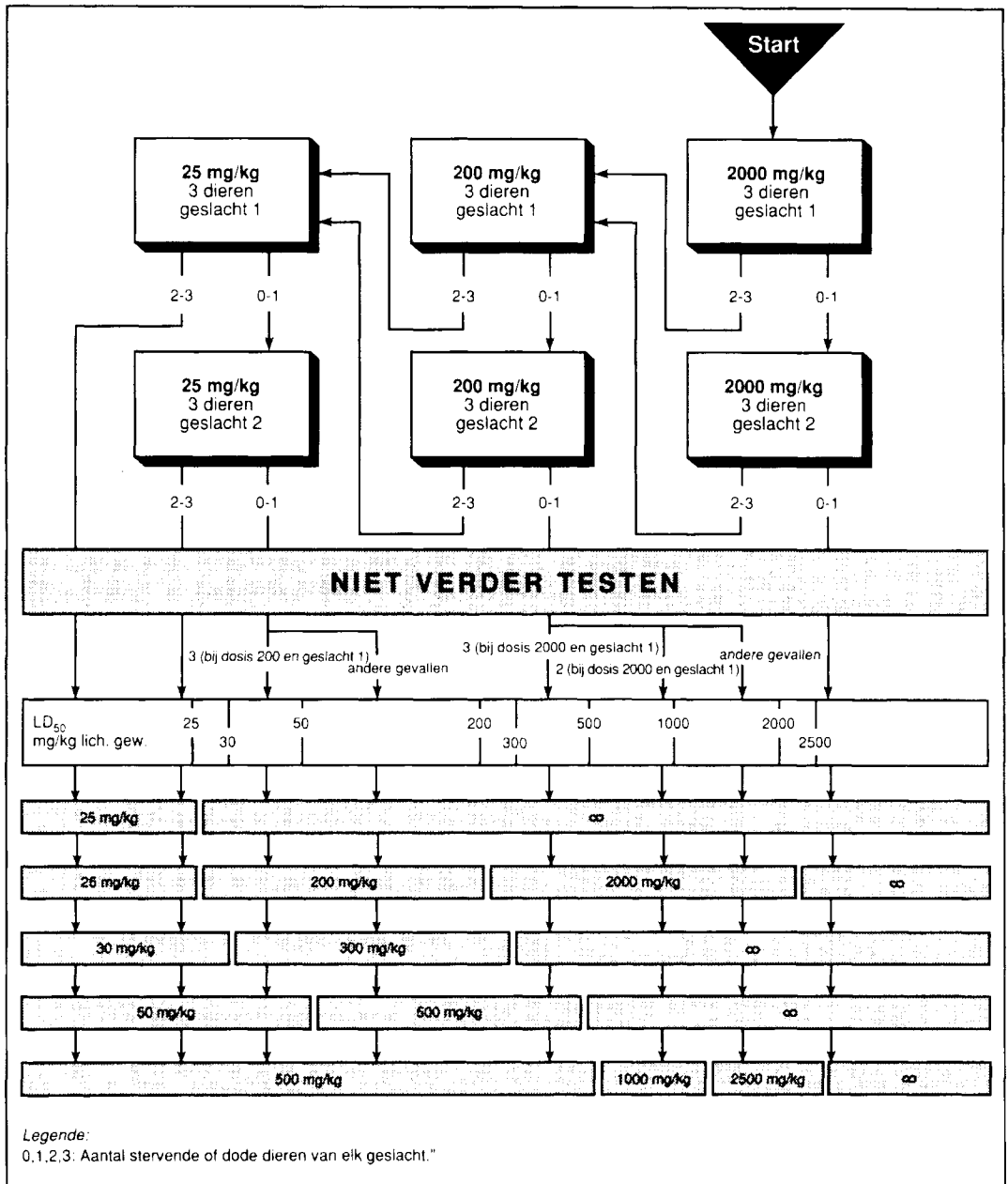
b) Interpretatie van de resultaten bij het testen volgens optie 1

Begindosis: 200 mg/kg lichaamsgewicht



c) Interpretatie van de resultaten bij het testen volgens optie 1

Begindosis: 2 000 mg/kg lichaamsgewicht



## B.2. ACUTE INHALATIETOXICITEIT

### 1. METHODE

#### 1.1. INLEIDING

Het is nuttig om over oriënterende informatie te beschikken ten aanzien van de deeltjesgrootte, de dampspanning, het smeltpunt, het kookpunt, het vlampunt en het ontplofingsgevaar (indien van toepassing) van de te onderzoeken stof.

Zie ook algemene inleiding deel B (punt A).

#### 1.2. DEFINITIES

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

#### 1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

#### 1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Verscheidene groepen proefdieren worden gedurende een vastgestelde periode aan geleidelijk stijgende concentraties van de teststof blootgesteld. Er wordt één concentratie per groep gebruikt. Vervolgens worden de symptomen en sterfte waargenomen. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het einde van de studie leven, wordt necropsie verricht.

Dieren die hevige en aanhoudende tekenen van angst en pijn vertonen, zouden op humane wijze moeten worden gedood. Het doseren van teststoffen op een manier waarvan bekend is dat deze als gevolg van corrosieve of ernstig irriterende eigenschappen pijn en ongemak veroorzaakt, hoeft niet te worden uitgevoerd.

#### 1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

#### 1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

##### 1.6.1. Voorbereidingen

Vóór het onderzoek worden de dieren ten minste 5 dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Gezonde jonge dieren worden op een willekeurige manier vóór de behandeling in het vereiste aantal groepen ingedeeld. Het is niet nodig de dieren aan een gesimuleerde blootstelling te onderwerpen, tenzij dit wenselijk is bij het type expositieapparatuur dat wordt gebruikt.

Vaste teststoffen moeten eventueel worden gemicroniseerd om deeltjes van geschikte grootte te verkrijgen.

Waar nodig wordt een passend medium aan de teststof toegevoegd, ten einde de juiste concentratie van de proefstof in de atmosfeer te bereiken; in dat geval moet ook een mediumcontrolegroep worden toegevoegd. Indien een medium of andere additieven worden gebruikt om de dosering te vergemakkelijken, moet bekend zijn dat deze geen toxische effecten veroorzaken. In voorkomend geval kunnen bestaande gegevens worden gebruikt.

##### 1.6.2. Proefomstandigheden

###### 1.6.2.1. Proefdieren

Tenzij er contra-indicaties bestaan, wordt de voorkeur gegeven aan ratten. De proef dient te worden uitgevoerd met een rattenstam die gewoonlijk in laboratoria wordt gebruikt. Per geslacht mag bij het begin van de studie het gewicht van de dieren die worden gebruikt, niet meer dan 20 % van het gemiddelde gewicht afwijken.



#### 1.6.2.2. *Aantal en geslacht*

Voor ieder concentratieniveau moeten ten minste tien knaagdieren (vijf wijfjes en vijf mannetjes) worden gebruikt. De wijfjes moeten nullipaar zijn en mogen niet zwanger zijn.

*Opmerking:* In acute-toxiciteitstesten met dieren van een hogere orde dan knaagdieren, dienen kleinere aantallen in overweging te worden genomen. De doses dienen zorgvuldig te worden gekozen, en alle moeite dient worden gedaan om matig toxische doses niet te boven te gaan. In dergelijke testen dient toediening van letale doses van de teststof te worden vermeden.

#### 1.6.2.3. *Blootstellingsconcentraties*

Bij de proeven moeten voldoende (ten minste drie) expositieconcentraties worden gebruikt die zodanig onderling verschillen dat proefgroepen worden verkregen met duidelijke verschillen in toxische effecten en sterftecijfers. De gegevens moeten voldoende zijn om een concentratie/respons-curve te verkrijgen en om, indien mogelijk, op aanvaardbare wijze een  $LC_{50}$  te bepalen.

#### 1.6.2.4. *Limiettest*

Als binnen een periode van 14 dagen geen sterfte wordt veroorzaakt door de expositie gedurende 4 uur van vijf mannelijke en vijf vrouwelijke proefdieren aan 20 mg/l in de vorm van een stofaërosol of aan 5 mg/l in de vorm van een vloeistofaërosol of van een stoffaërosol, is het wellicht niet noodzakelijk verdere proeven te nemen. Indien de test echter bij voornoemde concentratie tot sterfte of tot gevolg van de fysische of chemische eigenschappen van de teststof - waaronder ook de explosieve eigenschappen worden gerekend - niet kan worden uitgevoerd, moet in plaats van de voornoemde concentraties de maximaal mogelijke concentratie worden gebruikt.

#### 1.6.2.5. *Blootstellingstijd*

De blootstellingstijd bedraagt 4 uur.

#### 1.6.2.6. *Apparatuur*

De dieren worden aan de teststoffen blootgesteld met behulp van inhalatieapparatuur die zodanig gebouwd is dat kan worden gezorgd voor een dynamische luchtdoorstroming van ten minste 12 luchtverversingen per uur, een toereikend zuurstofgehalte en een gelijkmatige verdeling van de teststoffen in de atmosfeer. Als van een expositiekamer gebruik wordt gemaakt, moet deze op een zodanige wijze zijn ontworpen dat de dieren zo min mogelijk bij elkaar kunnen kruipen en zoveel mogelijk door inhalatie aan de teststof worden blootgesteld. Als algemene regel voor het verzekeren van een stabiele atmosfeer in de expositiekamer geldt, dat het totale „volume” van de proefdieren niet méér mag bedragen dan 5 % van het volume van de blootstellingskamer. Naar keuze kunnen de dieren oronasaal, alleen met hun kop of individueel met hun hele lijf aan de testlucht worden blootgesteld; de eerste twee methoden zullen ertoe bijdragen dat zo min mogelijk teststof via andere wegen in het lichaam wordt opgenomen.

#### 1.6.2.7. *Observatieperiode*

De observatieperiode moet ten minste 14 dagen bedragen. Deze duur van de observatie moet echter niet als een streng vastgelegde periode worden beschouwd, maar moet door de toxische reacties, het tijdstip waarop deze voor het eerst worden waargenomen en de duur van het herstel worden bepaald; de observatieperiode kan dus indien noodzakelijk, worden verlengd. Van belang zijn het tijdstip waarop toxische verschijnselen voor het eerst zijn waargenomen, het tijdstip waarop zij weer verdwijnen en het tijdstip waarop de dood intreedt, in het bijzonder wanneer de kans bestaat op een uitgestelde dood.

#### 1.6.3. *Uitvoering*

Kort vóór de blootstelling worden de dieren gewogen en vervolgens 4 uur lang aan de testconcentratie blootgesteld in het daarvoor bestemde apparaat, na evenwichtinstelling van de concentratie in de blootstellingskamer. De evenwichtinstelling mag niet veel tijd in beslag nemen. Tijdens de proef dient de temperatuur op  $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  te worden gehouden. In het ideale geval moet de relatieve vochtigheid tussen 30 % en 70 % worden gehouden, behalve waar dit niet goed uitvoerbaar is (bijvoorbeeld bij het testen van sommige aerosolen). Het onderhouden van een lichte onderdruk ( $\leq 5\text{ mm water}$ ) voorkomt het weglekken van de teststof naar de omgeving. Gedurende de blootstelling worden de dieren voedsel en water onthouden. Om de testatmosfeer te genereren en concentratiemetingen uit te voeren dienen geschikte systemen gebruikt te worden. Het systeem moet de waarborg bieden dat de expositieomstandigheden bij de proef zo spoedig mogelijk stabiel zijn. De kamer moet zo ontworpen en bediend kunnen worden dat een homogene verdeling van de testatmosfeer binnen de kamer wordt gehandhaafd.

De volgende parameters moeten worden gemeten of gemonitord:

- (a) de luchtdoorstromingssnelheid (continu) (luchtdebiet);
- (b) de feitelijke concentratie van de teststof in het ademhalingsgebied van de dieren, ten minste driemaal gemeten tijdens de blootstelling (sommige atmosferen, bijvoorbeeld aerosolen met hoge concentratie moeten eventueel vaker worden gecontroleerd). Tijdens de blootstelling mag de concentratie niet meer dan  $\pm 15\%$  van het gemiddelde afwijken. Bij sommige aerosolen is het mogelijk dat de concentratie niet binnen deze grenzen gehouden kan worden; in dat geval kan een grotere afwijking worden aanvaard. Voor aerosolen moet zo dikwijls als noodzakelijk is (ten minste éénmaal per testgroep) een analyse worden uitgevoerd om de verdeling van de deeltjesgrootte te bepalen;
- (c) de temperatuur en de vochtigheid; indien mogelijk continu.

Tijdens en na de blootstelling worden waarnemingen gedaan die voor ieder individueel dier worden geregistreerd. Tijdens de eerste dag moeten frequent waarnemingen worden verricht. Ten minste één keer per werkdag moet een zorgvuldig klinisch onderzoek worden verricht; overige waarnemingen moeten iedere dag worden gedaan waarbij erop moet worden toegezien dat er zo weinig mogelijk dieren voor het onderzoek verloren gaan, bijvoorbeeld door necropsie of koeling van dood aangetroffen dieren en afzondering of opoffering van zwakke of stervende dieren.

Bij het observeren moet in ieder geval aandacht worden besteed aan veranderingen van huid, vacht, ogen, slijmvliezen, ademhalingsorganen, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag. Er moet bijzondere aandacht worden besteed aan de waarneming van het ademhalingsgedrag, tremoren, convulsies, speekselvloed, diarree, lethargie, slaap en coma. Het tijdstip waarop de dood intreedt, moet zo nauwkeurig mogelijk worden geregistreerd. Het gewicht van ieder dier wordt na de expositie éénmaal per week en bij de dood van de dieren bepaald.

Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het eind van de proefnemingen leven, wordt necropsie verricht, waarbij vooral aandacht wordt besteed aan veranderingen in het bovenste en onderste gedeelte van de ademhalingswegen. Alle macroscopisch waarneembare pathologische veranderingen worden geregistreerd. Als hiertoe aanleiding bestaat, worden weefselmonsters genomen voor histopathologisch onderzoek.

## 2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: aantal dieren bij het begin van het onderzoek, tijdstip waarop de dood intreedt bij de individuele dieren, het aantal dieren dat andere toxiciteitsverschijnselen vertoont, een beschrijving van de toxische effecten en de bevindingen bij de necropsie. Veranderingen in het gewicht moeten worden berekend en geregistreerd indien de dieren langer dan één dag in leven blijven. Dieren die op humane wijze gedood worden omwille van angst en pijn in verband met de stofblootstelling worden geregistreerd als gestorven in verband met de stofblootstelling. Met behulp van een erkende methode wordt de  $LC_{50}$  bepaald. Bij de evaluatie van de gegevens moet ook aandacht worden besteed aan het eventuele verband dat bestaat tussen de blootstelling van de dieren aan de teststof en het aantal en de ernst van alle voorkomende afwijkingen, waaronder gedrags- en klinische afwijkingen, macroscopisch waarneembare beschadigingen, veranderingen in het lichaamsgewicht, sterfte en eventuele andere toxische effecten.

## 3. RAPPORTAGE

### 3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voeding, enzovoort;
- proefomstandigheden: Beschrijving van de expositieapparatuur met inbegrip van ontwerp, type, afmetingen, luchtbron, systeem voor het genereren van aerosolen, methode van luchtconditionering en de wijze waarop de dieren tijdens de proeven in een blootstellingskamer zijn ondergebracht (als deze gebruikt is). Er moet een beschrijving worden gegeven van de apparatuur voor het meten van de temperatuur, de vochtigheid, de concentraties en de verdeling van de deeltjesgrootte van het aerosol;

Gegevens betreffende de expositie:

Deze moeten tabellarisch worden gerangschikt en worden voorzien van gemiddelde waarden en een maat voor de variabiliteit (bijvoorbeeld standaardafwijking). Zij dienen, indien mogelijk, te omvatten:

- (a) de luchtdoorstromingssnelheid (luchtdebiet) door de inhalatieapparatuur;
- (b) temperatuur en vochtigheid van de lucht;

- (c) nominale concentraties (de totale hoeveelheid teststof die de inhalatieapparatuur wordt binnengeleid gedeeld door het luchrvolume);
- (d) aard van het eventuele medium;
- (e) feitelijke concentraties van de teststof in het ademhalingsgebied van de dieren;
- (f) massa-mediaan van de aërodynamische diameter (MMAD) en de geometrische standaard afwijking (GSD);
- (g) duur van de evenwichtsinstelling;
- (h) duur van de expositie;
- tabellarische gegevens betreffende de effecten per geslacht en concentratieniveau (dat wil zeggen het aantal dieren dat tijdens de proef stierf of gedood werd, het aantal dieren dat toxische verschijnselen vertoonde, het aantal blootgestelde dieren);
- het tijdstip gedurende of na de blootstelling waarop de dood intreedt, redenen en criteria voor het op humane wijze doden van dieren;
- alle waarnemingen;
- de  $LC_{50}$  voor beide geslachten bepaald aan het eind van de observatieperiode (waarbij de berekeningsmethode dient te worden omschreven);
- 95 %-betrouwbaarheidsinterval voor de  $LC_{50}$  (waar dit gegeven kan worden);
- dosis/sterfte-curve met helling (indien dit bij de gebruikte bepalingmethode mogelijk is);
- bevindingen bij de necropsie;
- eventuele histopathologische bevindingen;
- bespreking van de resultaten (speciale aandacht dient te worden besteed aan het effect van het op humane wijze doden van dieren tijdens de proeven op de berekende  $LC_{50}$ );
- interpretatie van de resultaten.

### 3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

### 4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (punt E).

### B.3. ACUTE DERMAL TOXICITEIT

#### 1. METHODE

##### 1.1. INLEIDING

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

##### 1.2. DEFINITIES

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

##### 1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

##### 1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof wordt in geleidelijk stijgende doseringen op de huid van verscheidene groepen proefdieren aangebracht. Er wordt één dosis per groep gebruikt. Vervolgens worden de symptomen en sterfte waargenomen. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het eind van de proefnemingen leven, wordt necropsie verricht.

Dieren die hevige en aanhoudende tekenen van nood en pijn vertonen, moeten eventueel op humane wijze worden gedood. Het doseren van teststoffen op een manier waarvan bekend is dat deze als gevolg van bijtende of irriterende eigenschappen pijn en nood veroorzaakt, behoeft niet te worden uitgevoerd.

##### 1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

##### 1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

###### 1.6.1. Voorbereidingen

Vóór het onderzoek worden de dieren in hun proefkooien ten minste 5 dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Gezonde, jong volwassen dieren worden op een willekeurige manier vóór de behandeling in groepen ingedeeld. Ongeveer 24 uur vóór de proef wordt het haar op het ruggedeelte van de romp van de proefdieren door knippen of scheren verwijderd; bij het knippen of scheren moet erop worden gelet dat de huid niet wordt bekrast, omdat daardoor de doorlaatbaarheid van de huid zou kunnen veranderen. Ten minste 10 % van de lichaamsoppervlakte moet voor het aanbrengen van de teststof worden onthaard. Bij een proef met vaste stoffen, die eventueel tot een poeder kunnen worden fijngemaakt, moet de teststof voldoende met water of, zo nodig, met een passend medium worden bevochtigd, zodat de stof goed in contact met de huid komt. Als van een medium gebruik wordt gemaakt, moet rekening worden gehouden met de invloed hiervan op de mate waarin de huid de teststof doorlaat. Vloeibare teststoffen worden in het algemeen onverdund gebruikt.

###### 1.6.2. Proefomstandigheden

###### 1.6.2.1. Proefdieren

Er kan gebruik worden gemaakt van volwassen ratten of konijnen. Ook andere diersoorten kunnen worden gebruikt, maar de noodzakelijkheid hiervan moet worden gerechtvaardigd. De proef dient te worden uitgevoerd met een stam die gewoonlijk in laboratoria wordt gebruikt. Per geslacht mag bij het begin van de studie het gewicht van de dieren die worden gebruikt, niet meer dan 20 % van het gemiddelde gewicht afwijken.

#### 1.6.2.2. *Aantal en geslacht*

Voor ieder dosisniveau moeten ten minste 5 knaagdieren worden gebruikt. Zij dienen van hetzelfde geslacht te zijn. Indien wijfjes worden gebruikt, moeten deze nullipaar zijn en niet zwanger. Indien informatie beschikbaar is die aantoonst dat één van beide geslachten duidelijk gevoeliger is, dienen dieren van dit geslacht gebruikt te worden.

*Opmerking:* In onderzoeken naar acute toxiciteit met dieren van een hogere orde dan knaagdieren, dienen kleinere aantallen in overweging te worden genomen. De doses dienen zorgvuldig te worden uitgekozen, en alle moeite dient te worden gedaan om matig toxische doses niet te boven te gaan. In dergelijke testen dient toediening van letale doses van de teststof te worden vermeden.

#### 1.6.2.3. *Dosisniveaus*

Bij de proeven moeten voldoende (ten minste drie) dosisniveaus worden toegepast die zodanig onderling verschillen dat proefgroepen worden verkregen met duidelijke verschillen in toxische effecten en sterftecijfers. Bij de vaststelling van de dosisniveaus moet rekening worden gehouden met alle mogelijke irriterende of corrosieve effecten. De gegevens moeten voldoende zijn om een dosis/respons-curve te maken en om, indien mogelijk, op aanvaardbare wijze een LD<sub>50</sub> te bepalen.

#### 1.6.2.4. *Limiettest*

Een limiettest met één dosis van ten minste 2 000 mg/kg lichaamsgewicht wordt uitgevoerd op een groep van 5 mannetjes en 5 wijfjes, met behulp van de hierboven beschreven testmethode. Indien sterfte wordt vastgesteld die met de teststof verband houdt, moet het uitvoeren van een volledig testprogramma overwogen worden.

#### 1.6.2.5. *Observatieperiode*

De observatieperiode moet ten minste 14 dagen bedragen. Deze duur van de observatie moet echter niet als een streng vastgelegde periode beschouwd worden, maar moet door de toxische reacties, het tijdstip waarop deze voor het eerst worden waargenomen en de duur van het herstel worden bepaald; de observatieperiode kan dus, indien noodzakelijk, worden verlengd. Van belang zijn het tijdstip waarop intoxicatieverschijnselen voor het eerst zijn waargenomen en het tijdstip waarop zij weer verdwijnen, hun duur en het tijdstip waarop de dood intreedt, in het bijzonder wanneer de kans bestaat voor een vertraagde sterfte.

#### 1.6.3. *Uitvoering*

Ieder dier moet individueel in een kooi worden gehuisvest. De teststof wordt gelijkmatig verdeeld over een oppervlak van ongeveer 10 % van de totale lichaamsoppervlakte. Bij zeer toxische stoffen mag het te behandelen oppervlak kleiner zijn, maar een zo groot mogelijke oppervlakte moet worden bedekt met een zo dun en zo gelijkmatig mogelijk aangebrachte laag.

De teststof moet gedurende de expositietijd van 24 uur door middel van poreus verbandgaas en niet-irriterend plakband in contact met de huid blijven. Het behandelde gedeelte van de huid moet op een geschikte wijze verder worden bedekt om het verbandgaas en de teststof op hun plaats te houden en om te verhinderen dat de dieren de teststof langs orale weg opnemen. Hulpmiddelen om de dieren te fixeren, kunnen worden gebruikt om te voorkomen dat de dieren de teststof via de mond opnemen, maar het wordt niet aangeraden de dieren volledig te immobiliseren.

Aan het eind van de expositieperiode wordt de resterende teststof — zo mogelijk met water — van de huid verwijderd of anderszins door middel van een andere geschikte reinigingstechniek.

De gedane waarnemingen moeten systematisch worden geregistreerd voor ieder individueel dier. Tijdens de eerste dag worden de dieren regelmatig geobserveerd. Ten minste één keer per werkdag moet een zorgvuldig klinisch onderzoek worden verricht. De andere waarnemingen moeten iedere dag worden verricht, waarbij erop moet worden toegezien dat er zo weinig mogelijk dieren voor het onderzoek verloren gaan, bijvoorbeeld door necropsie of koeling van dood aangetroffen dieren en door afzondering of opoffering van zwakke of stervende dieren.

Bij het observeren wordt aandacht besteed aan veranderingen van vacht, behandelde huid, ogen, slijmvliezen, ademhaling, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag. Er moet bijzondere aandacht worden besteed aan de waarneming van tremoren, speekselvloed, diarree, lethargie, slaap en coma. Het tijdstip waarop de dood intreedt moet zo nauwkeurig mogelijk worden geregistreerd. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het einde van de proefnemingen leven, wordt necropsie verricht. Alle macroscopisch waarneembare pathologische veranderingen worden geregistreerd. Als hiertoe aanleiding bestaat, worden weefselmonsters genomen voor histopathologisch onderzoek.

### *Bepaling van de toxiciteit bij het andere geslacht*

Na het voltooiën van de studie voor het ene geslacht, moet ten minste een groep van 5 dieren van het andere geslacht worden blootgesteld aan de stof om te verzekeren dat dit geslacht niet duidelijk gevoeliger is voor de teststof. In bepaalde gevallen kunnen redenen bestaan voor het gebruik van minder dieren. Indien voldoende informatie beschikbaar is om aan te tonen dat dieren van het geteste geslacht duidelijk gevoeliger zijn, mag het testen van het andere geslacht achterwege worden gelaten.

## 2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het tijdstip waarop de dood intreedt bij de individuele dieren, het aantal dieren dat andere intoxicatieverschijnselen vertoont, een beschrijving van de toxische effecten en de bevindingen bij de necropsie. Het gewicht van ieder individueel dier wordt bepaald kort voordat de teststof wordt aangebracht, en vervolgens één keer iedere week en ten slotte bij zijn dood; veranderingen in het gewicht worden berekend en geregistreerd, indien de dieren langer dan één dag in leven blijven. Dieren die op humane wijze gedood worden omwille van nood of ongemak en pijn in verband met de stof, worden geregistreerd als gestorven in verband met de stof. De LD<sub>50</sub> moet door middel van een erkende methode worden bepaald.

Bij de evaluatie van de gegevens moet ook aandacht worden besteed aan het eventuele verband dat bestaat tussen de blootstelling van de dieren aan de teststof en het aantal en de ernst van alle voorkomende afwijkingen, waaronder gedrags- en klinische afwijkingen, macroscopisch waarneembare beschadigingen, veranderingen in het lichaamsgewicht, sterfte en eventuele andere toxicologische effecten.

## 3. RAPPORTAGE

### 3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voeding, enzovoort;
- proefomstandigheden (met vermelding van de wijze waarop de huid is schoongemaakt en het soort verband: occlusief of niet occlusief);
- dosisniveaus (met het eventuele medium en de concentraties);
- het geslacht van de blootgestelde dieren;
- tabellarische gegevens betreffende de effecten per geslacht en dosisniveau (dat wil zeggen het aantal dieren dat tijdens de proef stierf of gedood werd, het aantal dieren dat intoxicatieverschijnselen vertoont, het aantal blootgestelde dieren);
- het tijdstip na de blootstelling waarop de dood intreedt, redenen en criteria voor het op humane wijze doden van dieren;
- alle waarnemingen;
- de LD<sub>50</sub> van het geslacht dat het volledige onderzoek onderging, bepaald na 14 dagen (waarbij de berekeningsmethode dient te worden omschreven);
- 95 %-betrouwbaarheidsinterval voor de LD<sub>50</sub> (waar dit gegeven kan worden);
- dosis/sterfte-curve met helling (indien dit bij de gebruikte bepalingmethode mogelijk is);
- bevindingen bij de necropsie;
- eventuele histopathologische bevindingen;
- resultaten van de test die eventueel op het andere geslacht werd uitgevoerd;
- bespreking van de resultaten (speciale aandacht dient besteed te worden aan het effect dat het op humane wijze doden van dieren tijdens de proeven zou kunnen hebben op de berekende LD<sub>50</sub>);
- interpretatie van de resultaten.

### 3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

## 4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (punt E).

### 3. **RAPPORTAGE**

#### 3.1. **VERSLAG VAN HET ONDERZOEK**

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voeding, enzovoort;
- proefomstandigheden;
- dosisniveaus (met het eventuele medium) en concentraties;
- gegevens over de toxische reacties naar geslacht en dosis;
- waar mogelijk het hoogste dosisniveau waarbij geen effect optreedt;
- tijdstip gedurende studie waarop dieren tussentijds sterven of aangeven of dieren tot het eind van de proef in leven bleven;
- toxische of andere effecten;
- tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en het verloop hiervan;
- gegevens over voedsel en lichaamsgewicht;
- uitgevoerde hematologische onderzoeken en alle resultaten;
- uitgevoerde klinisch-biochemische onderzoeken en alle resultaten;
- bevindingen bij de necropsie;
- een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
- waar van toepassing statistische behandeling van de resultaten;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

#### 3.2. **EVALUATIE EN INTERPRETATIE**

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

### 4. **LITERATUUR**

Zie algemene inleiding deel B (punt E).

## B.4. ACUTE TOXICITEIT (HUIDIRRITATIE)

### 1. METHODE

#### 1.1. INLEIDING

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

#### 1.2. DEFINITIES

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

#### 1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

#### 1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

##### *Inleidende overwegingen*

Voldoende aandacht dient gegeven te worden aan alle beschikbare gegevens over de te onderzoeken stof teneinde het testen van stoffen onder omstandigheden die ernstige reacties teweeg kunnen brengen te minimaliseren. De volgende informatie kan van nut zijn om te bepalen of een volledige test, een studie met één enkel dier, of geen verdere test moet worden uitgevoerd.

- i) Fysisch-chemische eigenschappen en chemische reactiviteit. Voor sterk zure of basische stoffen (bijvoorbeeld met een pH van kleiner of gelijk aan 2 of groter of gelijk aan 11,5) behoeven wellicht geen onderzoeken te worden uitgevoerd op primaire huidirritatie als bijtende eigenschappen verwacht kunnen worden. Ook dient rekening gehouden te worden met de basische of zure reserve.
- ii) Indien overtuigende gegevens voor ernstige effecten uit goedgevalideerde *in vitro* testen beschikbaar zijn, is een volledige test eventueel niet vereist.
- iii) Resultaten van acute toxiciteitsstudies. Indien een test op de acute toxiciteit langs dermale weg is uitgevoerd met de limietdosis van de stof (2 000 mg/kg lichaamsgewicht), en hierbij geen huidirritatie werd waargenomen, kan verder testen op huidirritatie onnodig zijn. Voorts is het testen van stoffen, waarvan werd aangetoond dat zij uiterst toxisch zijn langs dermale weg, onnodig.

De teststof wordt in één enkele dosis op de huid van verschillende proefdieren aangebracht. Ieder dier wordt als zijn eigen controle gebruikt. De graad van irritatie wordt na een bepaald tijdsverloop afgelezen en geregistreerd en wordt uitvoerig beschreven om een volledige evaluatie van de effecten mogelijk te maken. De duur van de waarnemingen moet voldoende zijn om het reversibele of irreversibele karakter van de waargenomen effecten ten volle te kunnen beoordelen.

Dieren die hevige en voortdurende tekenen van nood of ongemak en pijn vertonen, moeten eventueel op humane wijze worden gedood.

#### 1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

#### 1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

##### 1.6.1. Voorbereidingen

Ongeveer 24 uur vóór de proef wordt het haar op het ruggedeelte van de romp van de proefdieren door knippen of scheren verwijderd.

Bij het knippen of scheren moet erop worden gelet dat de huid niet wordt bekrast. Alleen dieren met een gezonde en gave huid mogen worden gebruikt.



Sommige konijnestammen hebben plekken met dichte haargroei, die in bepaalde perioden van het jaar meer op de voorgrond treden. De teststoffen mogen niet op deze zones met dichte haargroei worden aangebracht.

Bij een proef met vaste stoffen (die eventueel tot poeder kunnen worden fijngemaakt) moet de teststof voldoende met water of, zo nodig, met een passend medium worden bevochtigd, zodat de stof goed in contact met de huid komt. Als van een medium gebruik wordt gemaakt, moet rekening worden gehouden met de invloed hiervan op de irritatie van de huid door de teststof. Vloeibare teststoffen worden in het algemeen onverdund gebruikt.

## 1.6.2. Proefomstandigheden

### 1.6.2.1. Proefdieren

Hoewel er verschillende soorten zoogdieren gebruikt kunnen worden, is het albino konijn de soort die de voorkeur heeft.

### 1.6.2.2. Aantal dieren

Indien op grond van *in vitro*-screeningsresultaten of andere overwegingen wordt vermoed dat de teststof necrose zou kunnen veroorzaken (d.w.z. bijtend zou kunnen zijn), moet een test met één enkel dier worden overwogen. Als de resultaten van deze test niet wijzen op bijtende eigenschappen, moet het onderzoek vervolledigd worden met behulp van ten minste twee extra dieren.

Voor het volledige onderzoek worden ten minste drie gezonde volwassen dieren gebruikt. Er behoeven geen afzonderlijke dieren te worden gebruikt voor een onbehandelde controlegroep. Extra proefdieren kunnen vereist zijn ter opheldering van moeilijk te interpreteren resultaten.

### 1.6.2.3. Dosisniveau

Tenzij er contra-indicaties bestaan, wordt een dosis van 0,5 ml vloeistof of 0,5 g vaste of semi-vaste stof op het testgedeelte van de huid aangebracht. De onbehandelde huid dient als controle voor de test.

### 1.6.2.4. Observatieperiode

De duur van de waarneming moet niet als een streng vastgelegde periode worden beschouwd, maar moet lang genoeg zijn om het reversibele of irreversibele karakter van de geobserveerde effecten ten volle te kunnen beoordelen. De observatieperiode hoeft in de regel echter niet langer te duren dan 14 dagen vanaf de datum van de applicatie.

## 1.6.3. Uitvoering

De dieren moeten individueel in kooien worden gehuisvest. De teststof wordt aangebracht op een klein huidoppervlak (circa 6 cm<sup>2</sup>) en de plek wordt met gaas bedekt dat met behulp van niet-irriterend plakband op zijn plaats wordt gehouden. Bij gebruik van vloeistof of vloeibare pasta kan het nodig zijn de vloeistof eerst op het gaas aan te brengen en het gaas daarna op de huid te leggen. Het gaas moet voor de duur van de expositie in aanraking met de huid blijven door middel van een geschikt occlusief- of semi-occlusief verband. Er moet tevens voor worden gezorgd dat het dier niet in contact komt met het verband om opname van de teststoffen via de mond of door inhalatie te voorkomen.

Aan het einde van de blootstellingsperiode moet de resterende teststof zo mogelijk worden verwijderd met water of met een geschikt oplosmiddel zonder het bestaande effect of de toestand van de opperhuid te wijzigen.

De expositie duurt gewoonlijk 4 uur.

Indien vermoed wordt dat de stof necrose kan veroorzaken (bijvoorbeeld als deze een bijtende werking heeft) moet de expositieduur beperkt worden (bijvoorbeeld tot 1 uur of 3 minuten). Dergelijke testen kunnen ook in eerste instantie met één dier worden uitgevoerd, indien dit niet uitgesloten is door de acute dermale toxiciteit van de teststof, drie patches (gasjes) tegelijkertijd aan te brengen bij dit dier. Het eerste gaasje wordt verwijderd na drie minuten. Indien geen ernstige huidreactie wordt waargenomen, wordt na één uur het tweede gaasje verwijderd. Indien de observaties in dit stadium aantonen dat een vier uur durende blootstelling noodzakelijk is

en op humane wijze kan worden uitgevoerd, wordt het derde gaasje verwijderd na vier uur en worden daarna de resultaten beoordeeld. In dit geval (d.w.z. wanneer een vier uur durende blootstelling mogelijk was), dient de test te worden vervolledigd met ten minste twee extra dieren, tenzij dit niet humaan geacht wordt (bijvoorbeeld als necrose wordt waargenomen na de vier uur durende blootstelling).

Indien na 3 minuten of één uur een ernstige reactie van de huid (bijvoorbeeld necrose) wordt waargenomen, wordt het onderzoek onmiddellijk beëindigd.

Onder bepaalde omstandigheden, bijvoorbeeld gezien het verwachte toepassings- en blootstellingspatroon van de mens, kan het nodig zijn de blootstelling te verlengen.

#### 1.6.3.1. *Observatie en scoring*

De dieren moeten worden onderzocht op tekenen van erytheem en oedeem en de reacties moeten 60 minuten en vervolgens 24, 48 en 72 uur na de verwijdering van de patch (het gaasje) worden beoordeeld. De huidirritatie moet worden ingedeeld en geregistreerd volgens de in de tabel opgenomen schaal. Mogelijk moeten nog nadere waarnemingen worden verricht indien volledig herstel niet binnen de 72 uur is opgetreden. Behalve de waarneming van irritatie moeten eventuele ernstige beschadigingen zoals een bijtende werking (onomkeerbare vernietiging van huidweefsel) en andere toxische effecten volledig worden beschreven.

Technieken zoals histopathologisch onderzoek of meting van de dikte van de huidplooi kunnen worden gebruikt om twijfelachtige reacties of effecten die worden verhuld door verkleuring van de huid door de teststof, op te helderen.

## 2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor ieder dier afzonderlijk in tabellen worden samengevat: irritatiescores voor erytheem en oedeem gedurende de observatieperiode, ernstige beschadigingen, graad en aard van de irritatie, het reversibele of irreversibele karakter van de letsels, bijtende werking en alle andere waargenomen toxische effecten moeten worden beschreven.

## 3. RAPPORTAGE

### 3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voeding, enzovoort;
- proefomstandigheden (inclusief de belangrijkste fysisch-chemische eigenschappen van de gebruikte stof en de toegepaste techniek voor de ontharing en reiniging van de huid, alsmede het soort verband: oclusief of semi-occlusief);
- tabellarische rangschikking van de gegevens betreffende de irritatiereactie voor ieder afzonderlijk dier en voor iedere observatietijd (1, 24, 48, 72 uur, enzovoort, na verwijdering van het gaas);
- beschrijving van eventueel waargenomen ernstige letsels waaronder bijtende werking;
- beschrijving van de graad en de aard van de waargenomen irritatie en van histopathologische bevindingen indien van toepassing;
- beschrijving van eventuele toxische effecten, andere dan huidirritatie;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

### 3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

## 4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (punt E).

TABEL: HUIDREACTIESCHAAL

Vorming van erytheem en eschara

	Score
Geen erytheem .....	0
Zeer licht erytheem (nauwelijks zichtbaar) .....	1
Duidelijk begrensd erytheem .....	2
Matig tot ernstig erytheem .....	3
Ernstig erytheem (diepe roodheid) of korstvorming (wonden in de diepte) die aflezen van het erytheem onmogelijk maken .....	4

Oedeemvorming

Geen oedeem .....	0
Zeer licht oedeem (nauwelijks zichtbaar) .....	1
Licht oedeem (de randen van de zwelling zijn goed te onderscheiden door een duidelijke verhoging) . . . .	2
Matig oedeem (de randen zijn ongeveer 1 mm verhoogd) .....	3
Ernstig oedeem (de zwelling is meer dan 1 mm hoog en strekt zich uit tot buiten het behandelde gebied) . . . .	4

B.5. ACUTE TOXICITEIT (IRRITATIE VAN HET OOG)

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

1.2. DEFINITIES

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

*Inleidende overwegingen*

Voldoende aandacht dient gegeven te worden aan alle beschikbare gegevens over de te onderzoeken stof teneinde het testen van stoffen onder omstandigheden die ernstige reacties teweeg kunnen brengen te minimaliseren. De volgende informatie kan hiervoor van nut zijn.

- i) Fysisch-chemische eigenschappen en chemische reactiviteit. Sterk zure of basische stoffen die, bijvoorbeeld in het oog een pH van kleiner of gelijk aan 2, of groter of gelijk aan 11,5 geven, behoeven wellicht niet te worden onderzocht als ernstig letsel verwacht kan worden. Tevens dient rekening gehouden te worden met de basische of zure reserve.

- ii) Resultaten van goed gevalideerde alternatieve studies; stoffen waarvan is aangetoond dat zij potentieel bijtende of ernstig irriterende eigenschappen bezitten, dienen niet verder te worden getest op oogirritatie, daar kan worden aangenomen dat zulke stoffen ernstige effecten op de ogen zullen hebben in een test volgens deze methode.
- iii) Resultaten uit huidirritatiestudies. Stoffen waarvan is aangetoond dat zij duidelijk bijtende of ernstige huidirriterende eigenschappen bezitten tijdens een huidirritatiestudie, dienen niet verder te worden getest op oogirritatie, daar kan worden verondersteld dat zulke stoffen ernstige effecten op de ogen zouden kunnen hebben.

De teststof wordt in één enkele dosis op één van de ogen van ieder van de verschillende proefdieren aangebracht; het onbehandelde oog dient als controle. De graad van irritatie wordt op bepaalde tijdstippen beoordeeld en genoteerd en wordt uitvoeriger beschreven om een volledige evaluatie van de effecten mogelijk te maken. De duur van de waarnemingen moet voldoende lang zijn om het reversibele of irreversibele karakter van de waargenomen effecten ten volle te kunnen beoordelen.

Dieren die hevige en aanhoudende tekenen van nood/ongemak en pijn vertonen, moeten eventueel op humane wijze worden gedood.

## 1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

## 1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

### 1.6.1. Voorbereidingen

Beide ogen van ieder voorlopig voor de test geselecteerd proefdier moeten in de loop van de 24 uur voor het begin van de test worden onderzocht. Dieren die lijden aan oogirritatie, oogaandoeningen of een reeds bestaand hoornvliesletsel, mogen niet worden gebruikt.

### 1.6.2. Proefomstandigheden

#### 1.6.2.1. Proefdieren

Hoewel er diverse soorten proefdieren voor deze test gebruikt worden, wordt aanbevolen om bij de tests gebruik te maken van gezonde volwassen albino konijnen.

#### 1.6.2.2. Aantal proefdieren

Een onderzoek met slechts één proefdier dient te worden overwogen indien duidelijke effecten kunnen worden voorzien. Indien de resultaten van deze test met één konijn suggereren dat de stof ernstig irriterend (reversibel effect) of bijtend (irreversibel effect) is voor het oog bij gebruik van de beschreven procedure, behoeven mogelijk geen verdere testen op oogirritatie op de volgende dieren te worden uitgevoerd. In bepaalde gevallen kan het verder testen met extra dieren nuttig zijn om specifieke aspecten te onderzoeken.

In andere gevallen dan een onderzoek met slechts één dier moeten ten minste drie dieren worden gebruikt. Het aantal proefdieren mag worden opgevoerd in geval van moeilijk te interpreteren resultaten.

#### 1.6.2.3. Dosismiveau

Bij vloeistoffen wordt een dosis van 0,1 ml gebruikt. Bij vaste stoffen, pasta's en uit deeltjes samengestelde stoffen moet een volume van 0,1 ml of een gewicht van circa 0,1 g worden gebruikt (het gewicht moet altijd worden geregistreerd). Indien de teststof bestaat uit een vaste of korrelige stof, moet deze worden fijn gemalen. Het volume van de deeltjes moet worden gemeten na deze eerst zacht te hebben samengepakt, bijvoorbeeld door het tikken met de maathouder.

Bij vloeistoffen in pomp-sprays of spuitbussen onder druk moet de vloeistof worden verspreid en 0,1 ml worden opgevangen en in het oog worden gedruppeld, zoals beschreven voor vloeistoffen.

#### 1.6.2.4. Observatieperiode

De duur van de waarneming moet niet als een streng vastgelegde periode worden beschouwd. Ze moet echter voldoende lang zijn om het reversibele of irreversibele karakter van de waargenomen effecten te kunnen beoordelen, maar in de regel niet langer dan 21 dagen vanaf de toediening van de teststof.

### 1.6.3. UITVOERING

De dieren moeten individueel worden gehuisvest. Bij elk van de dieren wordt de teststof aangebracht in de bindvlieszak van één oog, waarbij het onderste ooglid voorzichtig van de oogbol wordt weggetrokken. De oogleden worden dan ongeveer één seconde zachtjes dichtgehouden om verlies van de teststof te voorkomen. Het andere oog, dat onbehandeld blijft, dient als controle.

Indien verwacht wordt dat de stof onredelijke pijn zou kunnen veroorzaken, mag een lokaal anestheticum worden gebruikt alvorens de te onderzoeken stof in te druppelen. Het soort, de concentratie en het tijdstip van toediening dienen zorgvuldig te worden gekozen om te verzekeren dat geen significante verschillen in reactie op de teststof optreden als gevolg van het gebruik van het lokale anestheticum. Het controle-oog dient op identieke wijze te worden verdoofd.

De ogen van de proefdieren mogen gedurende 24 uur na de toediening van de teststof niet worden uitgewassen. Na verloop van 24 uur kan dit zo nodig wel gebeuren.

Als uit de test blijkt dat een stof irriterend is, kunnen extra tests nodig zijn met gebruikmaking van konijnen waarvan de ogen kort na het indruppelen van de stof worden uitgespoeld. In deze gevallen wordt het gebruik van drie konijnen aanbevolen. Een halve minuut na de toediening worden de ogen van de konijnen een halve minuut lang uitgespoeld, waarbij het volume en de stroomsnelheid geen letsels mogen veroorzaken.

#### 1.6.3.1. *Observatie en scoring*

De ogen moeten worden onderzocht na 1, 24, 48 en 72 uur. Als er na 72 uur geen oogletsels zijn, kan het onderzoek worden beëindigd.

Verlenging van de observatieperiode kan nodig zijn in geval van een blijvende aandoening van het hoornvlies of andere oogirritaties, ten einde te bepalen of deze beschadigingen erger worden en reversibel of irreversibel van aard zijn. Behalve de observatie van het hoornvlies, de iris en de bindvliesen, moeten eventuele andere letsels die worden opgemerkt ook worden opgetekend en in het verslag worden vermeld. Bij ieder onderzoek moeten de oogreacties (tabel) worden beoordeeld en opgetekend. (De scoring van de oogreacties is voor verschillende interpretaties vatbaar. Ten behoeve van de testlaboratoria waar de proeven worden uitgevoerd en van degenen die de waarnemingen doen en interpreteren, kan een geïllustreerde handleiding over oogirritaties gebruikt worden.)

Het onderzoek van de reacties kan worden vergemakkelijkt met behulp van een binoculaire loep, een hand-spleetlamp, een biomicroscop of andere geschikte instrumenten. Nadat de waarnemingen na 24 uur zijn geregistreerd, kunnen de ogen van sommige of alle konijnen verder worden onderzocht met behulp van fluoresceïne.

## 2. GEGEVENS

Voor ieder dier afzonderlijk moeten de irritatie-scores op de vastgestelde observatietijdstippen in tabellen worden samengevat. Een beschrijving van de graad en aard van de irritatie, aanwezigheid van ernstige beschadigingen en optreden van effecten anders dan aan de ogen moeten in het rapport worden vermeld.

## 3. RAPPORTAGE

### 3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voeding, enzovoort;
- proefomstandigheden (inclusief de van belang zijnde fysisch-chemische eigenschappen van de teststof);
- tabel van irritatiereactie/bijtende werking van elk afzonderlijk dier op de verschillende observatietijdstippen (d.w.z. 1, 24, 48 en 72 uur);
- beschrijving van eventueel waargenomen ernstige beschadigingen;
- uitvoerige beschrijving van de graad en aard van de waargenomen irritatie of bijtende werking, met inbegrip van het betrokken gebied van de cornea, en het al dan niet reverseerbare karakter;

- beschrijving van de toegepaste methode voor het vaststellen van de irritatie na 1, 24, 48 en 72 uur (door hand-spleetlamp, biomicroscop, fluoresceïne);
- omschrijving van eventueel geconstateerde topicale effecten anders dan aan de ogen;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (punt E).

*Aanhangsel*

**TABEL: OOGIRRITATIESCHAAL**

**Hoornvlies**

*Opaciteit: graad van optische dichtheid (het gebied met de grootste dichtheid wordt beoordeeld)*

Geen verzwering of opaciteit .....	0
Verspreide of diffuse opake gebieden (andere dan een lichte vertroebeling van de normale glans), de details van de iris zijn nog duidelijk zichtbaar .....	1
Duidelijk te onderscheiden opake gebied, de details van de iris zijn iets vervaagd .....	2
Parelmoerkleurige gebieden, details van de iris niet meer zichtbaar, de omvang van de pupil is nog nauwelijks te onderscheiden .....	3
Volledig opake hoornvlies, het regenboogvlies is nietmeer te onderscheiden .....	4

**Iris**

Normaal .....	0
Duidelijk verdiepte rugae, congestie, zwelling, matige circumcorneale hyperemie rondom het hoornvlies of injectie, één van deze verschijnselen of een combinatie ervan, waarbij de iris nog op licht reageert (een trage reactie is positief) .....	1
Geen reactie op licht, bloeding, verregaande weefselvernietiging (één of meerdere van deze verschijnselen) .....	2

**Bindvlieszen**

*Roodheid (refereert naar het meest ernstige letsel van het bindvlies van de oogleden en oogbal in vergelijking tot het controleoog)*

Bloedvaten normaal .....	0
Duidelijke hyperemie van sommige bloedvaten (geinjecteerd) .....	1
Diffuse karmozijnrode verkleuring, afzonderlijke bloedvatenzijn niet gemakkelijk te onderscheiden .....	2
Diffuus vleeskleurig rood .....	3

*Chemosis: oogleden en/of derde ooglid (membrana nictitans)*

Geen zwelling .....	0
Zwelling, iets meer dan normaal (met inbegrip vanderde ooglid) .....	1
Duidelijke zwelling met gedeeltelijk uitpuilende oogleden .....	2
Zwelling met de oogleden ongeveer halfgesloten .....	3
Zwelling met oogleden voor meer dan de helft gesloten .....	4

## „B.6 SENSIBILISATIE VAN DE HUID

### 1. METHODE

#### 1.1. Inleiding

##### *Opmerkingen:*

De gevoeligheid en het vermogen van een test om stoffen op te sporen met potentieel huidsensibiliserende eigenschappen bij de mens zijn belangrijk in een systeem voor de classificatie van toxische stoffen ten behoeve van de volksgezondheid.

Er bestaat géén universele testmethode waarmee alle stoffen die de menselijke huid kunnen sensibiliseren, adequaat kunnen worden geïdentificeerd en die voor alle stoffen toepasbaar is.

Bij de keuze van een test moet rekening worden gehouden met factoren zoals de fysische kenmerken van een stof, met inbegrip van het vermogen om de huid binnen te dringen.

Er zijn twee soorten tests ontwikkeld die gebruik maken van cavia's: het type waarbij een adjuvans wordt gebruikt en waarbij een verhoogde allergische reactie wordt opgewekt door het oplossen of suspenderen van de teststof in Freund's compleet adjuvans (FCA), en tests waarbij geen adjuvans wordt gebruikt.

Proeven met adjuvans voorspellen een eventueel huidsensibiliserend effect van een stof bij mensen wellicht nauwkeuriger dan methoden die geen gebruik maken van Freund's compleet adjuvans; zij verdienen dan ook de voorkeur.

De maximalisatietest met cavia's is een algemeen toegepaste test waarbij een adjuvans gebruikt wordt. Alhoewel verschillende andere methoden kunnen worden gebruikt om het huidsensibiliserend vermogen van een stof aan te tonen, wordt de maximalisatietest beschouwd als de adjuvans-techniek die de voorkeur heeft.

Voor veel soorten chemicaliën worden tests waarbij geen adjuvans wordt gebruikt (de Buehlertest heeft de voorkeur) als minder gevoelig beschouwd.

In bepaalde gevallen kunnen er goede redenen zijn om de Buehlertest te verkiezen, met lokale applicatie in plaats van intradermale injectie zoals in de maximalisatietest met cavia's. Voor het gebruik van de Buehlertest dient een wetenschappelijke motivering te worden gegeven.

De maximalisatietest met cavia's en de Buehlertest worden hier beschreven. Andere methoden mogen worden gebruikt op voorwaarde dat zij goed zijn gevalideerd en wetenschappelijk verantwoord zijn.

Indien een erkende screeningtest werd uitgevoerd en daarbij een positief resultaat werd geconstateerd, mag de teststof als een potentieel sensibiliserende stof worden aangemerkt en is het niet nodig ook nog een test met cavia's uit te voeren. Indien een dergelijke test evenwel tot een negatief resultaat heeft geleid, moet een caviatest worden uitgevoerd overeenkomstig de onder deze testmethode beschreven procedure.

Zie ook algemene inleiding deel B.

#### 1.2. Definities

*Huidsensibilisatie* (allergische contactdermatitis): is een door een immunrespons veroorzaakte huidreactie op een stof. Bij mensen kan de reactie de vorm aannemen van jeuk, erytheem, oedeem (waterzucht), pukkels, blaasjes, blaren of een combinatie hiervan. Bij andere soorten kunnen de reacties anders zijn en kan alleen erytheem of oedeem optreden.

*Inductieblootstelling*: een experimentele blootstelling van een proefdier aan een teststof met de bedoeling een hypersensitieve toestand te induceren.

*Inductieperiode*: een periode van ten minste een week na de inductieblootstelling, gedurende welke een hypersensitieve toestand ontwikkeld kan worden.

*Provocatieblootstelling*: een experimentele blootstelling — na de inductieperiode — van een voorheen reeds blootgesteld proefdier aan een teststof, om vast te stellen of het dier een hypersensitieve reactie vertoont.

### 1.3. Referentiestoffen

De gevoeligheid en de betrouwbaarheid van de gebruikte technieken moet iedere zes maanden worden vastgesteld door het gebruik van stoffen waarvan bekend is dat ze lichte tot matige huidsensibiliserende eigenschappen hebben.

Bij een goed uitgevoerde test kan een reactie van ten minste 30 % worden verwacht bij een adjuvanstest en van ten minste 15 % bij een niet-adjuvanstest, bij gebruikmaking van zwakke/middelsterke sensibilisatoren.

De volgende stoffen genieten de voorkeur:

CAS-nummer	EINECS-nummer	EINECS-naam	Triviale naam
101-86-0	202-983-3	$\alpha$ -hexylcinnamaldehyde	$\alpha$ -hexylcinnamaldehyde
149-30-4	205-736-8	benzothiazol-2-thiol (mercapto-benzothiazol)	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzocaïne	norcaïne

Er kunnen omstandigheden zijn waarbij andere referentiestoffen, die aan bovenstaande eisen voldoen, kunnen worden gebruikt; dit moet wetenschappelijk verantwoord worden.

### 1.4. Principe van de testmethode

De proefdieren worden eerst aan de teststof blootgesteld door een intradermale injectie en/of epidermale toepassing (inductieblootstelling). Na een rustperiode van 10 tot 14 dagen (inductieperiode), tijdens welke een immunreactie op gang kan komen, worden de dieren blootgesteld aan een provocatiedosis. De omvang en intensiteit van de cutane reactie op de provocatieblootstelling bij de proefdieren wordt vergeleken met die van de controlegroep die een blanco behandeling ondergaat bij de industrie maar wél de provocatiedosis toegediend krijgt.

### 1.5. Beschrijving van de testmethoden

Als het nodig wordt geacht om de teststof te verwijderen, moet dit gebeuren met behulp van water of een ander geschikt oplosmiddel zonder dat de optredende reactie daardoor wordt beïnvloed of de opperhuid daardoor wordt geschonden.

#### 1.5.1. *Maximalisatietest met cavia's (GPMT)*

##### 1.5.1.1. Voorbereiding

Gezonde jonge volwassen albino cavia's worden ten minste 5 dagen voor het begin van de test geacclimatiseerd aan de laboratoriumomstandigheden. Voor de test worden de dieren op aselechte wijze verdeeld over de behandelingsgroepen. Verwijdering van het haar gebeurt door middel van knippen, scheren of eventueel door chemische ontharing, afhankelijk van de gebruikte testmethode. Er dient op te worden gelet dat de huid niet beschadigd wordt. De dieren worden gewogen vóór het begin en aan het einde van de test.

##### 1.5.1.2. Proefomstandigheden

###### 1.5.1.2.1. Proefdieren

Er wordt gebruik gemaakt van stammen albino cavia's die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt.

###### 1.5.1.2.2. Aantal en geslacht

Er kan gebruik worden gemaakt van mannelijke en/of vrouwelijke dieren. Vrouwelijke dieren moeten nullipaar zijn en mogen niet zwanger zijn.

Minimaal 10 dieren worden gebruikt voor de behandelde groep en ten minste vijf voor de controlegroep. Als er minder dan 20 testcavia's en 10 controlecavia's worden gebruikt en het niet mogelijk is om vast te stellen of de teststof sensibiliserende eigenschappen heeft, wordt ten sterkste aangeraden om meer dieren te testen zodat een totaal van ten minste 20 testdieren en 10 controledieren wordt bereikt.



### 1.5.1.2.3. Dosisniveaus

De concentratie van de teststof die voor iedere inductie wordt gebruikt moet systemisch goed te verdragen zijn en gelijk zijn aan de hoogste concentratie die lichte tot matige huidirritatie veroorzaakt. De concentratie die voor de provocatieblootstelling wordt gebruikt moet de hoogste niet-irriterende dosis zijn. Indien noodzakelijk, kunnen de juiste concentraties worden vastgesteld aan de hand van een verkennende studie bij twee of drie proefdieren. Hierbij kan worden overwogen gebruik te maken van met FCA behandelde proefdieren.

### 1.5.1.3. Procedure

#### 1.5.1.3.1. Inductie

##### Dag 0 — Testgroep

In de onthaarde schouderstreek worden drie paar injecties van 0,1 ml gegeven, zó dat van ieder paar er één aan elke zijde ligt:

Injectie 1: een 1:1-mengsel (volumeverhouding) van FCA en water of fysiologische zoutoplossing;

Injectie 2: de teststof in een geschikt vehiculum en in de geschikte concentratie;

Injectie 3: de teststof in de gekozen concentratie, opgelost in een 1:1-mengsel (volumeverhouding) van FCA en water of fysiologische zoutoplossing.

Voor injectie 3 worden de in water oplosbare teststoffen in water opgelost vóór het mengen met FCA. In vet oplosbare of onoplosbare stoffen worden in FCA gesuspenderd vóór het mengen met water. De uiteindelijke concentratie van de teststof moet gelijk zijn aan die welke voor injectie 2 wordt gebruikt.

De injecties 1 en 2 worden dicht bij elkaar en het dichtst bij het hoofd toegediend en injectie 3 aan de staartzijde van het testgebied.

##### Dag 0 — Controlegroep

Op dezelfde plaatsen als bij de proefdieren worden drie paar intradermale injecties van 0,1 ml toegediend:

Injectie 1: een 1:1-mengsel (volumeverhouding) van FCA en water of fysiologische zoutoplossing;

Injectie 2: het onverdunde vehiculum;

Injectie 3: een 50 %-formulering (gewicht/volume) van het vehiculum in een 1:1-mengsel (volumeverhouding) van FCA en water of fysiologische zoutoplossing.

##### Dag 5-7 — Testgroep en controlegroep

Als de te onderzoeken stof geen huidirritatie geeft wordt het testgebied ongeveer 24 uur vóór de plaatselijke inductiebehandeling na knippen en/of scheren behandeld met 0,5 ml van een 10 %-formulering van natriumlaurylsulfaat in vaseline om een plaatselijke irritatie op te wekken.

##### Dag 6-8 — Testgroep

Het testgebied wordt opnieuw onthaard. Een filtreerpapier (2 cm × 4 cm) wordt gedrenkt met de teststof in een geschikt vehiculum en door middel van een occlusief verband gedurende 48 uur op het testgebied aangebracht. De keuze van het vehiculum moet worden verantwoord. Vaste stoffen worden verpulverd en in een geschikt vehiculum opgenomen. Vloeistoffen kunnen, zo nodig, onverdund worden aangebracht.

##### Dag 6-8 — Controlegroep

Het testgebied wordt opnieuw onthaard. Op dezelfde wijze als bij de testgroep wordt alleen het vehiculum aangebracht en gedurende 48 uur met het testgebied in contact gehouden door een occlusief verband.

#### 1.5.1.3.2. Provocatie

##### Dag 20-22 — Testgroep en controlegroep

Beide flanken van de dieren uit de testgroep en de controlegroep worden onthaard. Op één flank van de behandelde dieren wordt een gaasje of cupje met de teststof aangebracht en, waar nodig, een gaasje of cupje met alleen het vehiculum op de andere flank. Door middel van een occlusief verband wordt het gaasje gedurende 24 uur met de huid in contact gehouden.

### 1.5.1.3.3. Observatie en scoring: testgroep en controlegroep

- Ongeveer 21 uur nadat het gaasje is verwijderd, wordt het provocatiegebied gereinigd en zo nodig zorgvuldig geknipt en/of geschoren en onthaard.
- Ongeveer 3 uur hierna (ongeveer 48 uur na het begin van de provocatie) wordt de reactie van de huid geobserveerd en geregistreerd volgens de in het aanhangsel vermelde scores.
- Ongeveer 24 uur na deze waarneming wordt een tweede waarneming gedaan (72 uur na aanvang provocatie) en eveneens geregistreerd.

Aangeraden wordt om de proefdieren en controledieren „blind” (d.w.z. zonder te weten of het test- of controledieren betreft) te scoren.

Als het nodig blijkt om opheldering te verkrijgen over de resultaten van de eerste provocatie kan na ongeveer een week een tweede provocatie (d.w.z. een herprovocatie) worden overwogen met, zo nodig, een nieuwe controlegroep. Herprovocatie kan ook plaatsvinden bij de oorspronkelijke controlegroep.

Alle reacties van de huid en alle ongewone bevindingen, waaronder ook systemische reacties, die het gevolg zijn van de inductie- en provocatieprocedures moeten worden geobserveerd en geregistreerd volgens de scoreschaal van Magnusson/Kligman (zie aanhangsel). Andere technieken zoals histopathologisch onderzoek of meting van de dikte van de huidplooi kunnen worden toegepast om klaarheid te verschaffen omtrent onduidelijke reacties.

### 1.5.2. *Buehlertest*

#### 1.5.2.1. Voorbereiding

Gezonde jonge volwassen albino cavia's worden ten minste 5 dagen voor het begin van de test geacclimatiseerd aan de laboratoriumomstandigheden. Voor de test worden de dieren op aselechte wijze verdeeld over de behandelingsgroepen. Verwijdering van het haar gebeurt door middel van knippen, scheren of eventueel door chemische ontharing, afhankelijk van de gebruikte testmethode. Er dient op te worden gelet dat de huid niet beschadigd wordt. De dieren worden gewogen vóór het begin en aan het eind van de test.

#### 1.5.2.2. Proefomstandigheden

##### 1.5.2.2.1. Proefdieren

Er wordt gebruik gemaakt van stammen albino cavia's die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt.

##### 1.5.2.2.2. Aantal en geslacht

Er kan gebruik worden gemaakt van mannelijke en/of vrouwelijke dieren. Vrouwelijke dieren moeten nullipaar zijn en mogen niet zwanger zijn.

Voor de behandelde groep worden minimaal 20 dieren gebruikt en voor de controlegroep ten minste 10.

##### 1.5.2.2.3. Dosisniveaus

De concentratie van de teststof die voor iedere inductie wordt gebruikt moet de hoogste zijn die lichte maar geen excessieve huidirritatie geeft. De concentratie die voor de provocatieblootstelling wordt gebruikt moet de hoogste niet-irriterende dosis zijn. Indien noodzakelijk, kunnen de juiste concentraties worden vastgesteld aan de hand van een verkennende studie bij twee of drie proefdieren.

Als de teststoffen in water oplosbaar zijn verdient water of een verdunde, niet-irriterende oplossing van een surfactans de voorkeur als vehiculum. Bij andere teststoffen wordt de voorkeur gegeven aan 80 % alcohol/water bij de inductie en aan aceton bij de provocatie.

#### 1.5.2.3. Procedure

##### 1.5.2.3.1. Inductie

Dag 0 — Testgroep

Eén flank wordt onthaard. Het testgaasje moet doordrenkt zijn met de teststof in een geschikt vehiculum (de keuze van het vehiculum moet worden verantwoord; vloeibare teststoffen kunnen eventueel onverdund worden aangebracht). Het testgaasje wordt op het testgebied aangebracht en daarmee gedurende 6 uur in contact gehouden door een occlusieve pleister of een cupje en een geschikt verband.

Het testgaasje moet afdekkend zijn. Er kan gebruik worden gemaakt van een rond of vierkant wattenschijfje met een oppervlakte van ongeveer 4-6 cm<sup>2</sup>. Om een goede afdekking te garanderen kan een passende voorziening worden gebruikt waardoor de bewegingsvrijheid van de dieren wordt beperkt. Bij gebruik van een zwachtel alléén kan herhaalde blootstelling nodig zijn.

#### Dag 0 — Controlegroep

Een flank wordt onthaard. Op dezelfde wijze als bij de testgroep wordt nu alleen het vehiculum aangebracht. Het testgaasje wordt op het testgebied aangebracht en daarmee gedurende 6 uur in contact gehouden door een occlusieve pleister of een cupje en een geschikt verband. Als kan worden aangetoond dat een blanco controlegroep niet nodig is, kunnen niet-behandelde dieren als controlegroep worden gebruikt.

#### Dag 6-8 en 13-15 — Testgroep en controlegroep

Hetzelfde testoppervlak van dezelfde flank ondergaat, na eventuele verwijdering van de beharing, op dag 6-8 en nogmaals op dag 13-15 dezelfde blootstelling als op dag 0.

#### 1.5.2.3.2. Provocatie

##### Dag 27-29 — Testgroep en controlegroep

De onbehandelde flank van de test- en controledieren wordt onthaard. Een occlusieve pleister of een cupje met de juiste hoeveelheid teststof in de maximale niet-irriterende concentratie, wordt aangebracht op het achterste deel van de flank van de testdieren en van de controledieren.

Indien dit wenselijk is wordt op het voorste gedeelte van de onbehandelde flank van zowel de testdieren als de controledieren een occlusieve pleister of een cupje met alleen het vehiculum aangebracht. De pleisters of cupjes worden gedurende 6 uur op hun plaats gehouden door een geschikt verband.

#### 1.5.2.3.3. Observatie en scoring

- Ongeveer 21 uur nadat de pleister is verwijderd wordt het provocatiegebied onthaard.
- Ongeveer 3 uur hierna (ongeveer 30 uur na het begin van de provocatie) wordt de reactie van de huid geobserveerd en geregistreerd volgens de in het aanhangsel vermelde scores.
- Ongeveer 24 uur na de 30-uurswaarneming wordt een tweede waarneming van de huidreacties gedaan (ongeveer 54 uur na aanvang van de provocatie) en worden de resultaten weer geregistreerd.

Aangeraden wordt om de testdieren en controledieren „blind” (d.w.z. zonder te weten of het test- of controledieren betreft) te scoren.

Als het nodig blijkt om opheldering te verkrijgen over de resultaten van de eerste provocatie kan na ongeveer een week een tweede provocatie (d.w.z. een herprovocatie) overwogen worden met, zo nodig, een nieuwe controlegroep. Herprovocatie kan ook plaatsvinden bij de oorspronkelijke controlegroep.

Alle reacties van de huid en alle ongewone bevindingen, waaronder ook systemische reacties, die het gevolg zijn van de inductie- en provocatieprocedures moeten worden geobserveerd en geregistreerd volgens de schaal van Magnusson/Kligman (zie aanhangsel). Andere technieken zoals histopathologisch onderzoek of meting van de dikte van de huidplooi kunnen worden toegepast om klaarheid te verschaffen omtrent onduidelijke reacties.

## 2. GEGEVENS (GPMT EN BUEHLERTEST)

Alle gegevens moeten in tabelvorm worden samengevat, waarbij voor ieder dier de bij iedere controle waargenomen huidreacties worden vermeld.

### 3. **RAPPORTAGE (GPMT EN BUEHLERTEST)**

Wanneer vóór de proef met cavia's een screeningstest wordt uitgevoerd, moet een beschrijving van of verwijzing naar de test in kwestie (bij voorbeeld de Local Lymph Node Assay (LLNA) of de Mouse Ear Swelling Test (MEST) worden gegeven en moeten bijzonderheden over de procedure worden verstrekt. Verder moeten de resultaten worden gerapporteerd die met de teststof en de referentiestof zijn verkregen.

#### **Verslag van de proefnemingen (GPMT en Buehlertest)**

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

##### *Proefdieren:*

- gebruikte caviastam;
- aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;
- herkomst, behuizing, dieet, enz.;
- gewicht van ieder dier bij het begin van de proefneming.

##### *Proefomstandigheden:*

- gebruikte techniek bij het prepareren van het te behandelen oppervlak;
- bijzonderheden met betrekking tot het pleister- of gaasmateriaal en de wijze van aanbrengen;
- resultaten van de voorstudie met conclusies over de inductie- en provocatieconcentraties die bij de test moeten worden gebruikt;
- bijzonderheden over de bereiding van de teststof, het toedienen en het verwijderen hiervan;
- motivering van de keuze van het vehiculum;
- concentraties van vehiculum en teststof die gebruikt zijn bij de inductie en de provocatie en de totale hoeveelheid teststof die gebruikt is voor inductie en provocatie.

##### *Resultaten:*

- een samenvatting van de resultaten van de meest recente gevoeligheids- en betrouwbaarheidscontrole (zie 1.3), met inbegrip van informatie over gebruikte teststof, concentratie en vehiculum;
- resultaten voor ieder dier afzonderlijk, inclusief scores;
- beschrijving van de aard en de intensiteit van de waargenomen effecten;
- eventuele histopathologische bevindingen.

##### *Bespreking van de resultaten.*

##### *Conclusies.*

### 4. **LITERATUUR**

Deze methode komt overeen met TG 406 van de OESO

---

TABEL:

**Magnusson/Kligman-scoreschaal voor de evaluatie van reacties op de provocatiepleister**

- 0 = geen zichtbare verandering
- 1 = discontinu of vlekkelig erytheem
- 2 = matig en aaneengesloten erytheem
- 3 = ernstig erytheem met zwelling"

—

## „B.7 TOXICITEIT (ORAAL) BIJ HERHAALDE TOEDIENING (28 DAGEN)

### 1. METHODE

#### 1.1 Inleiding

Zie algemene inleiding deel B

#### 1.2 Definities

Zie algemene inleiding deel B

#### 1.3. Principe van de testmethode

De teststof wordt gedurende een periode van 28 dagen dagelijks oraal-toegediend aan verschillende groepen proefdieren, in trapsgewijs stijgende doses. Er wordt één dosis per groep gebruikt. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks zorgvuldig geobserveerd om tekenen van toxiciteit te ontdekken. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven of worden afgemaakt, wordt een necropsie verricht. Dieren die aan het eind van het onderzoek nog in leven zijn worden afgemaakt en ook hierop wordt een necropsie verricht.

Bij deze methode ligt het accent meer op neurologische effecten als specifiek eindpunt. Benaadrukt moet worden dat het noodzakelijk is de dieren zorgvuldig klinisch te observeren om zoveel mogelijk informatie te verzamelen. Deze methode moet het mogelijk maken potentieel neurotoxische chemicaliën te identificeren, die in dit opzicht nader verdienen te worden onderzocht. Voorts kan deze methode aanwijzingen geven over immunologische effecten en toxiciteit voor de voortplantingsorganen.

#### 1.4. Beschrijving van de testmethode

##### 1.4.1. Voorbereidingen

Gezonde jonge volwassen dieren worden op aselechte wijze verdeeld over de controlegroep en de testgroepen. De kooien moeten op zodanige wijze worden opgesteld dat eventuele plaatseffecten geminimaliseerd worden. De dieren worden individueel geïdentificeerd en worden vóór het onderzoek ten minste 5 dagen in hun kooi gehouden ter acclimatisatie aan de laboratoriumomstandigheden.

De teststof wordt toegediend via een maagsonde of via de voeding of het drinkwater. De wijze van toedienen is afhankelijk van het doel van het onderzoek en de fysisch/chemische eigenschappen van de teststof.

Zo nodig moet de teststof worden opgelost of gesuspenderd in een geschikt vehiculum. Het verdient aanbeveling om zo mogelijk een waterige oplossing of suspensie te gebruiken. Als dit niet mogelijk is kan voor een oplossing of suspensie in olie (bij voorbeeld maïsolie) of in laatste instantie voor een oplossing in een ander medium worden gekozen. Van andere media dan water moeten de toxicologische karakteristieken bekend zijn. De stabiliteit van de teststof in het vehiculum moet worden vastgesteld.

##### 1.4.2. Proefomstandigheden

###### 1.4.2.1. Proefdieren

De voorkeur wordt gegeven aan ratten, hoewel andere knaagdiersoorten kunnen worden gebruikt. Er dient gebruik te worden gemaakt van jonge gezonde volwassen dieren van rattenstammen die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt. De wijfjes moeten nullipaar zijn en mogen niet zwanger zijn. De toediening moet zo snel mogelijk na het verspenen beginnen en in ieder geval vóór de dieren negen weken oud zijn.

Bij het begin van de studie moet de gewichtsvariatie van de dieren minimaal zijn en mag het gewicht van ieder dier niet meer dan 20 % afwijken van het gemiddelde gewicht.

Als een proef met herhaalde orale toediening wordt uitgevoerd als inleiding op een studie van langere duur, moeten de dieren in beide studies bij voorkeur tot dezelfde stam behoren en dezelfde oorsprong hebben.

###### 1.4.2.2. Aantai en geslacht

Op ieder dosisniveau moeten ten minste 10 dieren (5 mannetjes en 5 wijfjes) worden gebruikt. Indien het de bedoeling is sommige dieren tussentijds te doden, moet het aantal dieren worden verhoogd met het aantal dat volgens de proefopzet tussentijds zal worden gedood.

Daarnaast kan een satellietgroep van 10 dieren (5 per geslacht) gedurende 28 dagen worden behandeld met het hoge dosisniveau en vervolgens gedurende 14 dagen na de behandeling worden geobserveerd om na te gaan of de toxische effecten eventueel verdwijnen, voortduren of pas later tot uiting komen. Tevens wordt een satellietgroep van 10 controledieren (5 per geslacht) gebruikt.

#### 1.4.2.3. Dosisniveaus

In het algemeen zijn drie testgroepen en een controlegroep vereist. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren van de controlegroep op dezelfde wijze worden behandeld als de dieren in de testgroep. Indien een vehiculum wordt gebruikt bij het toedienen van de teststof moet de controlegroep het grootste gebruikte volume van dat vehiculum toegediend krijgen.

Als uit andere gegevens kan worden geconcludeerd dat bij een dagelijkse dosis van 1 000 mg/kg lichaamsgewicht geen effecten worden verwacht, kan een limiettest worden uitgevoerd. Als er geen bruikbare gegevens beschikbaar zijn, kan een studie worden uitgevoerd om de orde van grootte van de te gebruiken doses te helpen bepalen.

De dosisniveaus moeten worden gekozen in het licht van de bestaande gegevens over toxiciteit en (toxico)kinetica van de teststof en verwante stoffen. Het hoogste dosisniveau moet zó gekozen worden dat toxische effecten optreden, maar geen sterfte of ernstig lijden. Verder moet een dalende reeks doses worden gekozen met het oog op het vaststellen van een eventuele dosis-responsrelatie en het niveau zonder schadelijk effect (NOAEL) op het laagste dosisniveau. Dosisniveaus die telkens een factor 2 à 4 verschillen zijn vaak optimaal. Toevoeging van een vierde testgroep is vaak te prefereren boven een zeer groot niveauverschil (bij voorbeeld een factor 10 of meer) tussen de opvolgende doses.

Indien de stoffen via de voeding of het drinkwater worden toegediend is het van belang erop te letten dat de betrokken hoeveelheden teststof de normale voedings- of waterbalans niet verstoren. Als de teststof via de voeding wordt toegediend kan een vaste concentratie in de voeding (ppm) worden gebruikt óf een constant dosisniveau in termen van het lichaamsgewicht van het dier. Aangegeven moet worden welk alternatief is gebruikt. Bij gebruik van een maagsonde voor het toedienen van de teststof moet de dosis iedere dag op hetzelfde tijdstip worden gegeven en zo nodig worden aangepast om een constant dosisniveau per kg lichaamsgewicht te handhaven.

Als een studie met herhaalde toediening wordt gebruikt als voorloper van een studie op lange termijn moet bij beide studies soortgelijk voedsel worden verstrekt.

#### 1.4.2.4. Limiettest

Als volgens de hier beschreven procedures een proef wordt uitgevoerd met een dosisniveau van ten minste 1000 mg/kg lichaamsgewicht per dag — of, in het geval van toediening via het voedsel of het drinkwater, het equivalent percentage in het voedsel of het water (berekend overeenkomstig het lichaamsgewicht) — en er geen waarneembare toxische effecten optreden, en deze ook niet kunnen worden verwacht op grond van gegevens betreffende stoffen met verwante structuur, is het niet noodzakelijk een volledige proef met drie dosisniveaus te doen. De limiettest is van toepassing tenzij het niveau waarop de mens kan worden blootgesteld, testen met een hogere dosis noodzakelijk maakt.

#### 1.4.2.5. Observatieperiode

De dieren moeten 28 dagen worden geobserveerd. Dieren uit een satellietgroep die bestemd is voor vervolgaarnemingen moeten daarna nog ten minste 14 dagen zonder behandeling worden geobserveerd om de persistentie van de toxische effecten c.q. het herstel alsmede het eventuele optreden van vertraagde toxiciteit te kunnen waarnemen.

#### 1.4.3. Procedure

De dieren krijgen de teststof gedurende 28 dagen zeven maal per week toegediend. Indien de teststof vijf maal per week wordt toegediend moet dit worden verantwoord. Als de teststof wordt toegediend via een maagsonde, moet dit in één keer gebeuren onder gebruikmaking van een maagcatheter of een geschikte intubaticanule. De maximale hoeveelheid vloeistof die per keer kan worden toegediend hangt af van de grootte van het dier. Het volume mag niet meer zijn dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht, behalve als er een waterige oplossing wordt gebruikt, in welk geval 2 ml/100 g lichaamsgewicht is toegestaan. Met uitzondering van irriterende of bijtende stoffen, die gewoonlijk heviger effecten veroorzaken bij hogere concentraties, moet de variabiliteit van het testvolume worden geminimaliseerd door aanpassing van de concentratie, zodat op alle dosisniveaus hetzelfde constante testvolume wordt gebruikt.

#### 1.4.3.1. Algemene observaties

Algemene klinische waarnemingen moeten ten minste eenmaal per dag plaatsvinden, bij voorkeur steeds op hetzelfde tijdstip en met in achtname van de piekperiode van de te verwachten effecten na toediening. De gezondheidstoestand van de dieren moet worden geregistreerd. De dieren moeten ten minste tweemaal per dag worden geobserveerd op ziekteverschijnselen en sterfte. Stervende dieren en dieren die in grote nood verkeren of hevige pijn lijden moeten worden verwijderd, op humane wijze afgemaakt en aan een necropsie onderworpen.

Alle dieren worden éénmaal voor het begin van de proef nauwkeurig klinisch onderzocht (om intra-individuele vergelijking mogelijk te maken) en vervolgens ten minste eenmaal per week. Dit onderzoek moet buiten de kooi op een vaste onderzoekplaats en bij voorkeur steeds op hetzelfde tijdstip uitgevoerd worden. De resultaten moeten zorgvuldig worden geregistreerd, waarbij bij voorkeur gebruik wordt gemaakt van scoringsystemen die expliciet door het testlaboratorium zijn vastgelegd. Er moet zoveel mogelijk worden gezorgd dat variaties in de proefomstandigheden minimaal zijn en dat de waarnemers niet weten welke behandeling een gegeven dier heeft ondergaan. Tekenen waarop moet worden gelet zijn onder meer (maar niet alleen): veranderingen in huid, vacht, ogen, slijmvliezen, optreden van af- en uitscheiding, en onwillekeurige reacties zoals traanvorming, rechtopstaan van het haar, verandering van de pupilgrootte of een ongewoon ademhalingspatroon. Veranderingen in gang, houding en respons op vasthouden en ook het uitvoeren van clonische of tonische bewegingen, stereotypen (bij voorbeeld excessief poetsgedrag, ronddraaien) of afwijkend gedrag (bij voorbeeld zelfverminking, achteruitlopen) moeten worden geregistreerd.

Gedurende de vierde week van de blootstelling moet de sensorische reactiviteit op stimuli van verschillende aard (auditief, visueel en proprioceptief) worden bepaald en moet een bepaling van de grijpkracht en de motorische activiteit plaatsvinden. Nadere bijzonderheden omtrent de te volgen procedures zijn te vinden in de literatuur (zie algemene inleiding deel B).

Als de studie wordt verricht als voorstudie op een daaropvolgende subchronische (90-daagse) studie, kunnen functionele observaties in de vierde week achterwege worden gelaten. In dat geval moeten de functionele observaties in het bedoelde vervolgonderzoek plaatsvinden. Daar staat echter tegenover dat de beschikbaarheid van gegevens betreffende functionele prestaties uit de studie met herhaalde toediening, de keuze van de dosisniveaus voor de daaropvolgende subchronische studie ten goede kan komen.

Bij wijze van uitzondering kunnen functionele observaties ook achterwege blijven bij groepen die verder dermate sterke toxiciteitseffecten vertonen dat het testen van de functionele prestaties daarvoor ernstig wordt gehinderd.

#### 1.4.3.2. Lichaamsgewicht en voedel/waterconsumptie

Ieder dier moet ten minste eenmaal per week worden gewogen. De opgenomen hoeveelheid voedsel en water moet minstens eenmaal per week worden gemeten. Indien de teststof via het drinkwater wordt toegediend moet de waterconsumptie ook minstens eenmaal per week worden gemeten.

#### 1.4.3.3. Hematologie

Aan het eind van de testperiode moeten de volgende onderzoeken worden verricht: bepaling van de hematocriet en de hemoglobineconcentratie, erythrocytentelling, totale en differentieële leukocyten telling, plaatjestelling en bepaling van de stollingstijd en het stollingsvermogen.

De bloedmonsters worden genomen net vóór of tijdens het afmaken van de dieren; er dient te worden genoteerd uit welk lichaamsdeel. De monsters moeten onder de juiste omstandigheden worden bewaard.

#### 1.4.3.4. Klinische biochemie

Om belangrijke toxische effecten op de weefsels en met name op de nieren en de lever te onderzoeken, moet klinisch-biochemisch onderzoek verricht worden op bloedmonsters van alle dieren, met uitzondering van de dieren die stervend zijn aangetroffen of die voortijdig zijn afgemaakt. Deze monsters moeten juist vóór het afmaken of als onderdeel van de procedure hiervoor worden genomen. Het verdient aanbeveling om de dieren vóór het bloedafnemen een nacht te laten vasten<sup>(1)</sup>. Onderzoek van plasma en serum moet omvatten: natrium, kalium, glucose, totaal cholesterol, ureum, creatinine, totaal proteïne en albumine, ten minste twee enzymen die een indicatie geven van hepatocellulaire effecten (zoals alanineaminotransferase, aspartaataminotransferase, alkalische fosfatase, gamma- glutamyltranspeptidase en sorbitoldehydrogenase). Bepaling van andere enzymen (van hepatische of andere oorsprong) en galzuren kan onder bepaalde omstandigheden nuttige informatie geven.

<sup>(1)</sup> Voor een aantal bepalingen op serum en plasma, en met name voor de glucosebepaling, is een nacht vasten vóór de bloedafname wenselijk. De voornaamste reden is dat de toegenomen variabiliteit die onvermijdelijk het gevolg is van niet-vasten, subtiele effecten maskeert en de interpretatie bemoeilijkt. Daar staat tegenover dat een nacht vasten van invloed kan zijn op het algemene metabolisme van de dieren en dat dit in het bijzonder bij voedingsstudies, de dagelijkse blootstelling aan de teststof verstoort. Als men de dieren een nacht laat vasten moeten de klinisch-biochemische bepalingen verricht worden na de functionele observaties in week 4 van de studie.



De volgende facultatieve urineanalysebepalingen kunnen tijdens de laatste week van het onderzoek worden uitgevoerd op basis van een volgens een vast tijdschema verlopende urinemonstername: aspect, hoeveelheid, osmolaliteit of dichtheid, pH, proteïnen, glucose en bloed/bloedcellen.

Verder moet een onderzoek naar serummarkers van algemene weefselschade overwogen worden. Andere onderzoeken die moeten worden uitgevoerd als van de teststof bekend is, of vermoed wordt, dat zij de desbetreffende metabolische profielen beïnvloedt, zijn: calcium, fosfaat, triglyceriden (nuchterwaarde), specifieke hormonen, methemoglobine en cholesterinase. Deze moeten in het geval van teststoffen uit bepaalde klassen c.q. van geval tot geval worden geïdentificeerd.

In het algemeen is een flexibele aanpak noodzakelijk, afhankelijk van het soort proefdieren en het waargenomen en/of verwachte effect van een bepaalde stof.

Als bij gebrek aan referentiegegevens geen adequate vergelijkingsbasis voorhanden is, moet worden overwogen om hematologische en klinisch-biochemische variabelen te bepalen vóór met de toediening wordt begonnen.

#### 1.4.3.5. Macroscopische necropsie

Alle proefdieren uit het onderzoek moeten worden onderworpen aan een volledige, gedetailleerde macroscopische necropsie, die onder meer een zorgvuldig onderzoek van het uitwendig oppervlak van het lichaam, alle lichaamsopeningen en de hersen-, borst- en buikholtte en de organen daarin omvat. De lever, nieren, bijniere, testes, bijballen, zwezerik, milt, hersenen en het hart van alle dieren moeten worden ontdaan van alle aanhangend weefsel en zo snel mogelijk na dissectie in natte toestand worden gewogen om uitdroging te voorkomen.

De volgende weefsels moeten worden geconserveerd in het fixeermiddel dat zowel voor het type weefsel als het voorgenomen histopathologische onderzoek het meest geschikt is: alle grotere laesies, hersenen (representatieve delen waaronder de grote en kleine hersenen en de brug van Varol), ruggemerg, maag, dunne en dikke darm met plaques van Peyer, lever, nieren, bijniere, milt, hart, zwezerik, schildklier, luchtpijp en longen (conserveren door opblazen met een fixatief en dan onderdempelen), geslachtsklieren, secundaire geslachtsorganen (bij voorbeeld uterus, prostaat), urineblaas, lymfeklieren (bij voorkeur een klier die in de route van de toediening gelegen is en één die daar ver van verwijderd is, om rekening te houden met systemische effecten), perifere zenuwen (grote heupzenuw of scheenbeenzenuw), bij voorkeur dicht bij de spier, en een coupe van het beenmerg (of, in plaats daarvan, een direct op een objectglaasje aangebracht stukje opgezogen beenmerg). De resultaten van het klinische onderzoek en van andere onderzoeken kunnen aanleiding zijn om nog andere weefsels te bestuderen. Ook moeten alle andere organen worden, geconserveerd die, voor zover bekend is van de eigenschappen van de teststof, waarschijnlijk als doelorgaan fungeren.

#### 1.4.3.6. Histopathologisch onderzoek

Bij de dieren in de met de hoogste dosisniveau behandelde groep en bij de dieren in de controlegroep moet een volledig histopathologisch onderzoek worden verricht op de geconserveerde organen en weefsels. Als met de behandeling samenhangende veranderingen worden geconstateerd in de groep met de hoogste dosering, moet het onderzoek worden uitgebreid tot de dieren van alle andere doseringsgroepen.

Alle grotere laesies moeten worden onderzocht.

Indien gebruik wordt gemaakt van een satellietgroep moet ook dáárbij histopathologisch onderzoek worden verricht op alle organen die in de behandelde groep effecten vertonen.

## 2. GEGEVENS

Er moeten individuele gegevens worden verstrekt. Verder moeten alle gegevens worden samengevat in tabellen die voor iedere proefgroep laten zien: het aantal dieren aan het begin van de test, het aantal dieren dat tijdens de test is gestorven of om ethische redenen is afgemaakt en het tijdstip waarop, het aantal dat verschijnselen van toxiciteit vertoonde, een beschrijving van de waargenomen toxiciteitsverschijnselen, waaronder het tijdstip van aanvang, de duur en ernst van de verschijnselen, het aantal dieren dat laesies vertoonde, het soort laesie en het percentage dieren dat elk soort laesie vertoonde.

Zo mogelijk moeten de numerieke resultaten met behulp van een geschikte en algemeen geaccepteerde statistische methode worden geëvalueerd. De gebruikte methoden moeten reeds bij het ontwerpen van de studie worden gekozen.

### 3. **RAPPORTAGE**

#### **Verslag van het onderzoek**

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

##### *Proefdieren:*

- diersoort/stam;
- Aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;
- herkomst, behuizing, voeding enz.;
- individueel gewicht als bepaald aan het begin van de test, daarna met wekelijkse intervallen en aan het einde van de test.

##### *Proefomstandigheden:*

- motivering van de keuze van het vehiculum als dit geen water was;
- motivering voor de keuze van het dosisniveau;
- bijzonderheden over de bereiding van het teststof/voedselpreparaat, bereikte concentratie, stabiliteit en homogeniteit van het preparaat;
- bijzonderheden over het toedienen van de teststof;
- conversie van teststofconcentratie in voedsel/drinkwater (ppm) naar actuele dosis (mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing;
- bijzonderheden over het soort voedsel en het drinkwater.

##### *Resultaten:*

- lichaamsgewicht/veranderingen hierin;
- voedsel- en waterconsumptie, indien van toepassing;
- gegevens over de toxische respons, waaronder tekenen van toxiciteit, uitgesplitst per geslacht en dosisniveau;
- aard, ernst en duur van de klinische verschijnselen (al of niet reversibel);
- sensorische activiteit, grijpkracht en motorische activiteit;
- hematologisch onderzoek (met relevante vergelijkingsbasis);
- klinisch-biochemisch onderzoek (met relevante vergelijkingsbasis);
- lichaamsgewicht bij het afmaken en gegevens over het gewicht van de organen;
- resultaten van de necropsie;
- een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
- absorptiegegevens, indien beschikbaar;
- statistische verwerking van de gegevens, waar relevant.

##### *Bespreking van de resultaten.*

##### *Conclusies*

### 4. **LITERATUUR**

Deze methode komt overeen met TG 407 van de OESO.\*

---

## B.8. TOXICITEIT (INHALATIE) BIJ HERHAALDE TOEDIENING (28 DAGEN)

### 1. METHODE

#### 1.1. INLEIDING

Het is nuttig om over oriënterende informatie te beschikken ten aanzien van de deeltjesgrootteverdeling, de dampspanning, het smeltpunt, het kookpunt, het vlampunt en het ontploffingsgevaar (indien van toepassing) van de te onderzoeken stof.

Zie verder algemene inleiding deel B (punt A).

#### 1.2. DEFINITIES

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

#### 1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

#### 1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Verscheidene groepen proefdieren worden gedurende een periode van 28 dagen dagelijks een bepaalde tijd aan geleidelijk stijgende concentraties van de teststof blootgesteld. Er wordt een concentratie per groep gebruikt. Indien een medium wordt gebruikt om de juiste concentratie van de teststof in de atmosfeer te bereiken, moet een mediumcontrolegroep worden toegevoegd. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks geobserveerd om tekenen van toxiciteit te ontdekken. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het eind van de proefnemingen leven, wordt necropsie verricht.

#### 1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

#### 1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

##### 1.6.1. Voorbereidingen

Vóór het onderzoek worden de dieren ten minste 5 dagen onder gelijke huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als gedurende de proef. Gezonde jonge dieren worden op willekeurige wijze voor het onderzoek in het vereiste aantal groepen ingedeeld. Waar nodig wordt een passend medium aan de teststof toegevoegd ten einde de juiste concentratie van de teststof in de atmosfeer te bereiken. Indien een medium of andere additieven worden gebruikt om de dosering te vergemakkelijken, moet bekend zijn dat deze geen toxische effecten veroorzaken. In voorkomend geval kunnen bestaande gegevens worden gebruikt.

##### 1.6.2. Proefomstandigheden

###### 1.6.2.1. Proefdieren

Tenzij er contra-indicaties zijn, wordt de voorkeur gegeven aan ratten. Er dient gebruik te worden gemaakt van jonge gezonde dieren van rattenstammen die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt.

Bij het begin van de studie mag het gewicht van de dieren die bij de test worden gebruikt niet meer dan  $\pm 20\%$  van het betreffende gemiddelde gewicht afwijken.

#### 1.6.2.2. *Aantal en geslacht*

Voor iedere testgroep moeten ten minste tien dieren (vijf wijfjes en vijf mannetjes) worden gebruikt. De wijfjes moeten nullipaar zijn en niet zwanger. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal worden verhoogd met het aantal dieren dat volgens plan voor de voltooiing van de studie zal worden gedood. Daarnaast kan een satellietgroep van tien dieren (vijf per geslacht) gedurende 28 dagen worden behandeld met het hoogste concentratieniveau, waarna zij nog gedurende 14 dagen na de behandeling worden geobserveerd om na te gaan of de toxische effecten eventueel verdwijnen, voortduren of pas later tot uiting komen. Tevens wordt een satellietgroep van tien controledieren (vijf per geslacht) gebruikt.

#### 1.6.2.3. *Blootstellingsconcentraties*

Ten minste drie concentraties met een controle of een mediumcontrole (overeenkomend met de concentratie van het medium bij het hoogste expositieniveau), indien een medium wordt gebruikt, zijn vereist. Afgezien van de toediening van de teststof moeten de dieren in de controlegroep op dezelfde wijze als de dieren in de testgroepen worden behandeld. De hoogste concentratie moet leiden tot toxische effecten, maar er mogen geen of weinig sterfgevallen voorkomen. Bij de laagste concentratie mogen geen tekenen van toxiciteit optreden. Indien het blootstellingsniveau van de mens kan worden geschat, moet de laagste concentratie deze overschrijden. In het ideale geval treden bij de middelste concentratie minimaal waarneembare toxische effecten op. Bij meer dan één tussencentratie moet het verschil tussen de concentraties zo groot zijn dat een gradatie in toxische effecten wordt verkregen. In de groep met de laagste concentratie, in de tussengroepen en in de controlegroepen mogen niet veel sterfgevallen voorkomen, omdat anders een zinvolle evaluatie van de resultaten niet mogelijk is.

#### 1.6.2.4. *Blootstellingstijd*

De dagelijkse blootstellingstijd bedraagt 6 uur, maar een afwijkende duur kan in verband met specifieke vereisten nodig zijn.

#### 1.6.2.5. *Apparatuur*

De dieren worden aan de teststoffen blootgesteld met behulp van inhalatieapparatuur die zodanig is gebouwd dat kan worden gezorgd voor een dynamische luchtdoorstroming van ten minste 12 luchtverversingen per uur, een toereikend zuurstofgehalte en een gelijkmatige verdeling van de teststof in de atmosfeer. Als van een expositiekamer gebruik wordt gemaakt, moet deze op zodanige wijze zijn ontworpen dat de dieren zo min mogelijk bij elkaar kunnen kruipen en zoveel mogelijk door inhalatie aan de teststof worden blootgesteld. Als algemene regel voor het verzekeren van een stabiele atmosfeer in de expositiekamer geldt dat het totale „volume” van de proefdieren niet méér mag bedragen dan 5 % van het volume van de blootstellingskamer. Naar keuze kunnen de dieren oronasaal, alleen met hun kop of individueel met hun hele lijf aan de testlucht worden blootgesteld; de eerste twee methoden zullen ertoe bijdragen dat zo min mogelijk teststof via andere wegen in het lichaam wordt opgenomen.

#### 1.6.2.6. *Observatieperiode*

De proefdieren moeten tijdens de gehele periode van behandeling en herstel dagelijks op tekenen van toxiciteit worden onderzocht. Het tijdstip waarop de dood intreedt, het tijdstip waarop toxische verschijnselen voor het eerst zijn waargenomen en het tijdstip waarop zij weer verdwijnen, moeten worden genoteerd.

#### 1.6.3. *Uitvoering*

De dieren worden gedurende een periode van 28 dagen, 5 tot 7 dagen per week aan de teststof blootgesteld. Dieren in satellietgroepen voor latere waarnemingen moeten nog 14 dagen zonder behandeling worden gehouden om herstel of voortduren van de toxische effecten te kunnen vaststellen. Tijdens de proefnemingen dient de temperatuur op  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  te worden gehouden.

In het ideale geval moet de relatieve vochtigheid tussen 30 % en 70 % worden gehouden, behalve waar dit niet goed uitvoerbaar is (bijvoorbeeld bij het testen van sommige aerosolen). Het onderhouden van een lichte onderdruk ( $\leq 5\text{ mm water}$ ) voorkomt het weglekken van de teststof naar de omgeving. Gedurende de blootstelling worden de dieren voedsel en water onthouden.

Er moet gebruik worden gemaakt van een dynamisch inhalatiesysteem met een geschikt systeem voor de analytische controle van de concentratie. Aanbevolen wordt in een verkennende proef vast te stellen welke blootstellingsconcentraties voor de proeven het meest geschikt zijn. De doorstromingssnelheid moet zodanig worden aangepast dat de condities in de expositiekamer homogeen zijn. Het systeem moet waarborgen dat de omstandigheden bij de proef zo spoedig mogelijk stabiel zijn.

De volgende parameters moeten worden gemeten of gemonitord:

- a) de luchtdoorstromingssnelheid (luchtdebiet) (continu);
- b) de feitelijke concentratie van de teststof in het ademhalingsgebied. Tijdens de dagelijkse blootstelling mag de concentratie niet méér dan  $\pm 15\%$  van het gemiddelde afwijken. Bij sommige aerosolen is het mogelijk dat de concentratie niet binnen deze grenzen gehouden kan worden; in dat geval kan een grotere afwijking worden aanvaard. Tijdens de gehele duur van de studie moeten de dagelijkse concentraties zo constant mogelijk worden gehouden. Voor aerosolen moet ten minste éénmaal per week bij elke testgroep de deeltjesgrootteverdeling worden geanalyseerd;
- c) de temperatuur en de vochtigheid (continu, indien mogelijk);

Tijdens en na de blootstelling worden waarnemingen gedaan die voor elk individueel dier systematisch worden geregistreerd. Alle dieren moeten dagelijks worden geobserveerd; tekenen van toxiciteit moeten worden genoteerd met het tijdstip waarop deze voor het eerst optreden en de mate en de duur ervan. Bij het observeren wordt in ieder geval aandacht besteed aan veranderingen van huid en vacht, ogen, slijmvliezen, ademhalingsorganen, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag. Wekelijks moeten de dieren worden gewogen. Het wordt eveneens aanbevolen het voerbruik wekelijks te meten. De dieren moeten regelmatig worden geobserveerd, om te voorkomen dat ze voor de studie verloren gaan als gevolg van oorzaken als kannibalisme, autolyse van weefsels of omdat de dieren in verkeerde kooien zijn geplaatst. Na afloop van de onderzoeksperiode wordt bij alle overlevende dieren in de behandelde groepen (afgezien van de dieren in de satellietgroep) necropsie verricht. Stervende dieren of dieren met hevige angst of pijn, moeten meteen na ontdekking worden verwijderd en op een humane manier worden gedood; bij hen wordt eveneens necropsie verricht.

Na afloop van de proeven moet bij alle dieren, met inbegrip van die uit de controlegroep, het volgende worden onderzocht:

- i) hematologie, waarbij ten minste bepaling van hematocriet en hemoglobinegehalte, erythrocytentelling, totale en gedifferentieerde telling van de leucocyten en meting van stollingseigenschappen moeten worden uitgevoerd.
- ii) klinisch-biochemische bepalingen in het bloed waarbij ten minste één parameter van de leverfunctie en nierfunctie wordt bekeken: serum alanineaminotransferase (vroegere benaming: serum glutaminezuur-pyruviedruivenzuur-transaminase (SGPT)), serum aspartaataminotransferase (vroegere benaming: serum glutaminezuur-oxaalazijnzuur-transaminase (SGOT)), ureum, albumine, bloedcreatinine, totaal bilirubine en totaal serumeiwit.

Voor een goede toxicologische evaluatie kan het nodig zijn het onderzoek uit te breiden met: calcium, fosfor, chloride, natrium, kalium, glucosegehalte in nuchtere toestand, analyse van de lipiden, hormonen, zuur/base-evenwicht, methemoglobine en cholinesterase-activiteit.

Zo nodig kan verder klinisch-biochemisch onderzoek worden verricht om het onderzoek van de waargenomen effecten uit te breiden.

#### 1.6.3.1. *Macroscopische necropsie*

Bij alle dieren in de studie moet een volledige macroscopische necropsie worden uitgevoerd. Zo spoedig mogelijk na sectie moeten ten minste lever, nieren, bijnieren, longen en testes nat worden gewogen om te voorkomen dat ze uitdrogen. Organen en weefsels (de ademhalingswegen, lever, nieren, milt, testes, bijnieren, hart en alle organen die macroscopisch waarneembare afwijkingen of veranderingen in omvang vertonen) moeten in een geschikt medium worden bewaard voor eventueel histopathologisch onderzoek. De longen moeten in hun geheel worden verwijderd, gewogen en behandeld worden met een geschikt fixatief om ervoor te zorgen dat de longstructuur intact blijft.

#### 1.6.3.2. *Histopathologisch onderzoek*

Bij de dieren in de hoge concentratiegroep en bij de dieren in de controlegroep(en) moet histopathologisch onderzoek op de bewaarde organen en weefsels worden verricht. Organen en weefsels die bij het hoogste concentratieniveau door de teststof blijken te zijn beschadigd, moeten in alle groepen met een lagere dosering worden onderzocht. Bij het histopathologisch onderzoek van dieren in satellietgroepen moet speciaal worden gelet op organen en weefsels waar, bij de andere behandelde groepen, effecten blijken te zijn opgetreden.

## 2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek en het aantal dieren waarbij ieder type beschadiging voorkomt.

Alle waargenomen resultaten moeten met behulp van een geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

### 3. RAPPORTAGE

#### 3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voeding, enzovoort;
- proefomstandigheden:

Beschrijving van de blootstellingsapparatuur met inbegrip van ontwerp, type, afmetingen, luchtbron, systeem voor het genereren van aerosolen, methode van luchtconditionering, behandeling van de afgevoerde lucht en de wijze waarop de dieren tijdens de proeven in een blootstellingskamer zijn ondergebracht als deze is gebruikt. Er moet een beschrijving worden gegeven van de apparatuur voor het meten van de temperatuur, de vochtigheid en, in voorkomend geval, de stabiliteit van de concentratie of de deeltjesgrootteverdeling van de aerosolen.

Gegevens betreffende de blootstelling:

Deze moeten tabellarisch worden gerangschikt en worden voorzien van gemiddelde waarden en een maat voor de variabiliteit (bijvoorbeeld standaardafwijking). Zij dienen zo mogelijk te omvatten:

- a) de luchtdoorstromingssnelheid (luchtdebiet) door de inhalatieapparatuur;
  - b) temperatuur en vochtigheid van de lucht;
  - c) nominale concentraties (de totale hoeveelheid teststof die de inhalatieapparatuur wordt binnengeleid, gedeeld door het luchtvolume);
  - d) aard van het eventuele medium;
  - e) feitelijke concentraties van de teststof in het ademhalingsgebied van de dieren;
  - f) massa-mediaan van de aërodynamische diameter (MMAD) en de geometrische standaardafwijking (GSD);
- gegevens over de toxische reactie per geslacht en concentratie;
  - tijdstip gedurende de studie waarop de dood intreedt, of aangeven of de dieren tot het einde van de proef in leven bleven;
  - beschrijving van toxische of andere effecten; hoogste niveau waarbij geen effect wordt waargenomen;
  - tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel wordt waargenomen en het verloop hiervan;
  - gegevens over voedselconsumptie en lichaamsgewicht;
  - uitgevoerde hematologische proeven en alle resultaten;
  - uitgevoerde klinisch-biochemische proeven en alle resultaten;
  - bevindingen bij de necropsie;
  - een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
  - waar mogelijk statistische behandeling van de resultaten;
  - bespreking van de resultaten;
  - interpretatie van de resultaten.

#### 3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

### 4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (punt E).

## B.9. TOXICITEIT (DERMAAL) BIJ HERHAALDE TOEDIENING (28 DAGEN)

### 1. METHODE

#### 1.1. INLEIDING

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

#### 1.2. DEFINITIES

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

#### 1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

#### 1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof wordt gedurende een periode van 28 dagen dagelijks in geleidelijk stijgende doseringen op de huid van verscheidene groepen proefdieren aangebracht. Er wordt één dosis per groep gebruikt. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks geobserveerd om tekenen van toxiciteit te ontdekken. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het eind van de proef leven, wordt necropsie verricht.

#### 1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

#### 1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

##### 1.6.1. Voorbereidingen

Voor het onderzoek worden de dieren ten minste 5 dagen onder gelijke huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef voorkomen. Gezonde jonge dieren worden op willekeurige wijze voor de behandeling ingedeeld bij testgroepen en controlegroepen. Kort voor de proef wordt het haar op het ruggedeelte van de romp van de proefdieren geknipt; het haar kan ook worden geschoren, maar dit moet dan ongeveer 24 uur voor de proef worden gedaan. Gewoonlijk zal het dier ongeveer om de week opnieuw moeten worden geknipt of geschoren. Bij het knippen of scheren moet erop worden gelet dat de huid niet wordt bekrast. Ten minste 10 % van de lichaamsoppervlakte moet voor het aanbrengen van de teststof worden onthaard. Bij het bepalen van de oppervlakte die moet worden onthaard en de afmetingen van de aan te brengen bedekking moet rekening worden gehouden met het gewicht van het dier. Bij een proef met vaste stoffen, die eventueel tot poeder kunnen worden fijngemaakt, moet de teststof voldoende met water of, zo nodig, met een passend medium worden bevochtigd, zodat de stof goed in contact met de huid komt. Vloebare teststoffen worden in het algemeen onverdund gebruikt. De teststof wordt gedurende 5 tot 7 dagen per week dagelijks aangebracht.

##### 1.6.2. Proefomstandigheden

###### 1.6.2.1. Proefdieren

Er kan gebruik worden gemaakt van volwassen ratten, konijnen of cavia's. Ook andere diersoorten kunnen worden gebruikt, maar de noodzaak hiervoor moet worden aangetoond.

Bij het begin van de studie mag het gewicht van de dieren die bij de test worden gebruikt niet meer dan  $\pm 20\%$  van het gemiddelde gewicht afwijken.

#### 1.6.2.2. *Aantal en geslacht*

Voor ieder dosisniveau moeten ten minste tien dieren (vijf wijfjes en vijf mannetjes) met een gezonde huid worden gebruikt. De wijfjes moeten nullipaar zijn en niet zwanger. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal worden verhoogd met het aantal dieren dat volgens plan voor de voltooiing van de studie zal worden gedood. Daarnaast kan een satellietgroep van tien dieren (vijf per geslacht) gedurende 28 dagen worden behandeld met het hoge dosisniveau waarna zij nog gedurende 14 dagen na de behandeling worden geobserveerd om na te gaan of de toxische effecten eventueel verdwijnen, voortduren of pas later tot uiting komen. Tevens wordt een satellietgroep van tien controledieren (vijf per geslacht) gebruikt.

#### 1.6.2.3. *Dosisniveau*

Ten minste drie dosisniveaus, met een controlegroep of een mediumcontrolegroep, indien een medium wordt gebruikt, zijn vereist. De expositieduur moet ten minste 6 uur per dag bedragen. De teststof moet iedere dag op ongeveer dezelfde tijd worden aangebracht; op vastgestelde tijden (iedere week of twee keer per week) is een correctie vereist om ervoor te zorgen dat het dosisniveau in verhouding tot het lichaamsgewicht van het dier constant blijft. Afgezien van de toediening van de teststof moeten de dieren in de controlegroep op dezelfde wijze als de dieren in de proefgroep worden behandeld. Indien een medium is gebruikt om het doseren te vergemakkelijken moet aan de mediumcontrolegroep op dezelfde wijze als aan de testgroep een dosis van het medium worden toegediend en deze dosis moet even groot zijn als die van de dieren in de groep met het hoogste dosisniveau. Het hoogste dosisniveau van de teststof moet leiden tot toxische effecten, maar er mogen geen of weinig sterfgevallen voorkomen. Bij het laagste dosisniveau mogen geen tekenen van toxiciteit optreden. Indien het blootstellingsniveau van de mens kan worden geschat, moet het laagste niveau deze overschrijden. In het ideale geval treden bij het middelste dosisniveau minimaal waarneembare toxische effecten op. Bij meer dan één tussendosis moet het verschil tussen de dosisniveaus zo groot zijn dat een gradatie in toxische effecten wordt verkregen. In de groep met de laagste dosis en in de tussengroepen, alsmede in de controlegroepen, mogen niet veel sterfgevallen voorkomen, omdat anders een zinvolle evaluatie van de resultaten niet mogelijk is.

Indien toediening van de teststof tot ernstige huidirritatie leidt, moeten de concentraties worden verlaagd, wat vermindering of ontbreken van andere toxische effecten bij het hoge dosisniveau tot gevolg kan hebben. Indien de huid ernstig is beschadigd, kan het zelfs noodzakelijk zijn de studie te beëindigen en een nieuwe studie met lagere concentraties te beginnen.

#### 1.6.2.4. *Limiettest*

Indien bij een verkennende proef geen toxische effecten optreden bij een dosisniveau van 1 000 mg/kg, of een hoger niveau dat verband houdt met het niveau waaraan de mens, voor zover bekend, kan worden blootgesteld, is het wellicht niet noodzakelijk om verdere proeven te nemen.

#### 1.6.2.5. *Observatieperiode*

De proefdieren moeten dagelijks worden onderzocht op tekenen van toxiciteit. Het tijdstip waarop de dood intreedt, het tijdstip waarop toxiciteitsverschijnselen voor het eerst zijn waargenomen en het tijdstip waarop zij weer verdwijnen, moeten worden opgetekend.

#### 1.6.3. *Uitvoering*

De dieren moeten afzonderlijk in kooien worden gehuisvest. De dieren worden gedurende een periode van 28 dagen, zo mogelijk 7 dagen per week, met de teststof behandeld. Dieren in eventuele satellietgroepen voor latere waarnemingen moeten nog 14 dagen zonder behandeling worden gehouden om herstel of voortduren van de toxische effecten te kunnen vaststellen. De blootstellingstijd moet 6 uur per dag bedragen.

De teststof moet gelijkmatig worden aangebracht over een oppervlakte van ongeveer 10 % van de totale lichaamsoppervlakte. Bij zeer toxische stoffen kan de te bedekken oppervlakte kleiner zijn, maar een zo groot mogelijke oppervlakte moet worden bedekt met een zo dun en gelijkmatig mogelijk aangebrachte laag.

De teststof moet gedurende de blootstellingstijd door middel van poreus gaasverband en niet-irriterend plakband in contact met de huid worden gehouden. Het testgedeelte van de huid moet op geschikte wijze verder worden bedekt om het verbandgaas en de teststof op hun plaats te houden en om te verhinderen dat de dieren de teststof via de mond opnemen. Hulpmiddelen om de dieren te fixeren kunnen worden gebruikt om te voorkomen dat de dieren de teststof via de mond opnemen, maar het wordt niet aangeraden de dieren volledig te immobiliseren. Als alternatief kan een „beschermende halskraag” worden gebruikt.



Aan het einde van de blootstellingsperiode wordt de resterende teststof zo mogelijk met water van de huid verwijderd of anders door middel van een andere geschikte reinigingstechniek.

Alle dieren moeten dagelijks worden geobserveerd; tekenen van toxiciteit moeten worden genoteerd met inbegrip van het tijdstip waarop deze voor het eerst optraden en de mate en de duur ervan. Bij het observeren moet aandacht worden besteed aan veranderingen van de huid, de vacht, de ogen en de slijmvliezen, de ademhalingsorganen, de bloedsomloop, het autonome en het centrale zenuwstelsel, de somatomotorische activiteit en het gedrag. Wekelijks moeten de dieren worden gewogen. Het is eveneens aanbevolen het voerconsumptie wekelijks te meten. De dieren moeten regelmatig worden geobserveerd om te voorkomen dat zij voor de studie verloren gaan als gevolg van oorzaken als kannibalisme, autolyse van weefsels of omdat de dieren in verkeerde kooien zijn geplaatst. Na afloop van de onderzoeksperiode wordt bij alle overlevende dieren in de behandelde groepen (afgezien van de dieren in de satellietgroep), necropsie verricht. Indien stervende dieren of dieren met hevige nood/ongemak of pijn worden aangetroffen, moeten deze worden verwijderd en op een humane manier worden gedood; bij hen wordt eveneens necropsie verricht.

Na afloop van de studie moeten bij alle dieren, met inbegrip van die uit de controlegroepen, de volgende onderzoeken worden uitgevoerd:

- 1) Hematologie waarbij ten minste bepaling van hematocriet en hemoglobinegehalte, erythrocytentelling, totale en gedifferentieerde telling van de leucocyten en meting van stollingsvermogen.
- 2) Klinisch-biochemische bepalingen in het bloed waarbij ten minste één parameter van de lever- en nierfunctie: serum alanineaminotransferase (vroegere benaming: serum glutaminezuur-pyrodruivenzuur-transaminase (SGPT)), serum aspartaataminotransferase (vroegere benaming: serum glutaminezuur-oxaalazijnzuur-transaminase (SGOT)), ureum, albumine, bloedcreatinine, totaal bilirubine en totaal serumeiwit.

Voor een goede toxicologische evaluatie kan het nodig zijn het onderzoek uit te breiden met: calcium, fosfor, chloride, natrium, kalium, glucosegehalte bij nuchtere toestand, analyse van de lipiden, hormonen, zuur-base-evenwicht, methemoglobine en cholinesterase-activiteit.

Zo nodig kan verder klinisch-biochemisch onderzoek worden verricht om het onderzoek van de waargenomen effecten uit te breiden.

#### 1.6.4. Macroscopische necropsie

Bij alle dieren in de studie moet een volledige macroscopische necropsie worden uitgevoerd. Zo spoedig mogelijk na sectie moeten ten minste lever, nieren, bijnieren en testes nat worden gewogen om te voorkomen dat ze uitdrogen. Organen en weefsels (de normale en de behandelde huid, lever, nieren, milt, testes, bijnieren, hart en alle organen die macroscopisch waarneembare beschadigingen of veranderingen in omvang vertonen) moeten in een geschikt medium worden bewaard voor eventueel later histopathologisch onderzoek.

#### 1.6.5. Histopathologisch onderzoek

Bij de dieren in de groep die een hoge dosis heeft ontvangen en bij die in de controlegroep moet histopathologisch onderzoek op de bewaarde organen en weefsels worden verricht. Organen en weefsels die bij het hoogste doseringsniveau door de teststof blijken te zijn beschadigd, moeten in alle groepen met een lagere dosering worden onderzocht. Bij het histopathologisch onderzoek van de dieren in de satellietgroep moet speciaal worden gelet op de organen en weefsels waar, bij de andere behandelde groepen, effecten blijken te zijn opgetreden.

## 2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek en het aantal dieren waarbij ieder type beschadiging voorkomt.

Alle waargenomen resultaten moeten met behulp van een geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

### 3. **RAPPORTAGE**

#### 3.1. **VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN**

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, dieet, enzovoort;
- proefomstandigheden (met inbegrip van het soort verband: occlusief of niet-occlusief);
- dosisniveaus (met het eventueel medium) en concentraties;
- waar mogelijk het hoogste dosisniveau waarbij geen effect optreedt;
- gegevens over de toxische reactie naar geslacht en dosis;
- tijdstip gedurende de studie waarop de dood intreedt, of aangeven of dieren tot het eind van de proef bleven leven;
- toxische of andere effecten;
- tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en het verloop hiervan;
- gegevens over voedsel en lichaamsgewicht;
- uitgevoerde hematologische proeven en alle resultaten;
- uitgevoerde klinisch-biochemische proeven en alle resultaten;
- bevindingen bij de necropsie;
- een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
- waar mogelijk statistische behandeling van de resultaten;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

#### 3.2. **EVALUATIE EN INTERPRETATIE**

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

### 4. **LITERATUUR**

Zie algemene inleiding deel B (punt E).

## „B.10. MUTAGENITEIT — IN-VITROTEST OP CHROMOSOOMAFWIJINGEN IN ZOOGDIERCELLEN

### 1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 473 van de OESO: In-vitrotest op chromosoomafwijkingen in zoogdiercellen (1997).

#### 1.1. INLEIDING

De in-vitrotest op chromosoomafwijkingen is bedoeld om te bepalen welke stoffen structurele chromosoomafwijkingen bij gekweekte menselijke cellen veroorzaken (1)(2)(3). Er zijn twee soorten structurele afwijkingen: het chromosoomtype en het chromatidetype. De meeste chemische mutagenen veroorzaken afwijkingen van het chromatidetype, maar ook het chromosoomtype komt voor. Een toename van polyploidie kan erop wijzen dat een chemische stof numerieke afwijkingen kan veroorzaken. Deze methode is echter niet opgezet om numerieke afwijkingen te meten en wordt normaal gesproken niet voor dat doel gebruikt. Chromosoommutaties en soortgelijke voorvallen veroorzaken veel genetische ziekten bij de mens en het lijkt er sterk op dat chromosoommutaties en soortgelijke voorvallen die veranderingen in oncogenen en tumorsuppressorgenen van somatische cellen veroorzaken, betrokken zijn bij de inductie van kanker bij de mens en bij proefdieren.

Bij de in-vitrotest op chromosoomafwijkingen kunnen culturen van permanente cellijnen, celstammen of primaire celculturen worden gebruikt. De gebruikte cellen worden geselecteerd op basis van het groeivermogen in een cultuur, de stabiliteit van het karyotype, het aantal chromosomen, de verscheidenheid van de chromosomen en de frequentie van spontane chromosoomafwijkingen.

Bij in vitro uitgevoerde tests moet er meestal een exogene metabole activeringsbron worden gebruikt. Dit metabole activeringssysteem kan de omstandigheden in een zoogdiercel in vivo niet volledig nabootsen. Er moet goed op worden gelet dat omstandigheden die kunnen leiden tot positieve resultaten die niet het gevolg zijn van intrinsieke mutageniteit maar door veranderingen in de pH of de osmolaliteit of een sterke cytotoxiciteit worden veroorzaakt, worden vermeden (4)(5).

Deze test wordt gebruikt voor de screening op mogelijke mutagenen en carcinogenen voor zoogdieren. Veel stoffen die positief op deze test reageren, zijn carcinogeen voor zoogdieren, maar er is geen absolute correlatie tussen deze test en carcinogeniteit. De correlatie is afhankelijk van de chemische klasse en het lijkt er steeds meer op dat er carcinogenen zijn die met deze test worden gesignaleerd omdat ze blijikbaar via andere mechanismen dan directe DNA-beschadiging werken.

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

#### 1.2. DEFINITIES

**Afwijking van het chromatidetype:** structurele chromosoombeschadiging waarbij breuken in individuele chromatiden ontstaan, eventueel gevolgd door recombinatie.

**Afwijking van het chromosoomtype:** structurele chromosoombeschadiging waarbij breuken in beide chromatiden op dezelfde plaats ontstaan, eventueel gevolgd door recombinatie.

**Endoreduplicatie:** een proces waarbij de kern na een S-fase met DNA-replicatie niet tot mitose overgaat, maar opnieuw een S-fase begint. Het resultaat is chromosomen met 4, 8, 16, ... chromatiden.

**Hiaat:** een achromatische beschadiging die kleiner is dan de breedte van één chromatide en waarbij de fout in de uitlijning van de chromatiden minimaal is.

**Mitotische index:** de verhouding tussen het aantal cellen in de metafase en het totale aantal cellen in een populatie; deze index geeft een indicatie van de snelheid waarmee deze populatie zich voortplant.

**Numerieke afwijking:** een verandering in het aantal chromosomen ten opzichte van het normale aantal dat kenmerkend is voor de gebruikte cellen.

**Polyploidie:** het voorkomen van een ander veelvoud van het haploïde aantal chromosomen ( $n$ ) dan het diploïde aantal (d.w.z.  $3n$ ,  $4n$ , enz.).

**Structurele afwijking:** een verandering in de chromosoomstructuur die bij microscopisch onderzoek tijdens de metafase van de celdeling kan worden waargenomen in de vorm van deleties, fragmenten en intra- of interchromosomale uitwisselingen.

### 1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Celculturen worden zowel met als zonder metabole activering aan de teststof blootgesteld. Op vooraf bepaalde tijdstippen na de blootstelling van de celculturen aan de teststof worden ze met een metafasestopper (bv. Colcemid® of colchicine) behandeld, geoogst en gekleurd en worden de cellen in de metafase microscopisch onderzocht op de aanwezigheid van chromosoomafwijkingen.

### 1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

#### 1.4.1. Voorbereiding

##### 1.4.1.1. Cellen

Er kunnen verschillende soorten cellijnen, stammen of primaire celculturen worden gebruikt, waaronder ook menselijke cellen (bv. fibroblasten van Chinese hamsters of menselijke of van andere zoogdieren afkomstige perifere bloedlymfocyten).

##### 1.4.1.2. Media en kweekomstandigheden

Er moet worden gezorgd voor geschikte kweekmedia en incubatieomstandigheden (kweekvat,  $\text{CO}_2$ -concentratie, temperatuur en vochtigheid) voor de culturen. Permanente cellijnen en stammen moeten geregeld worden gecontroleerd om na te gaan of het modale aantal chromosomen stabiel is en er geen besmetting met mycoplasma heeft plaatsgevonden: indien dit laatste het geval is, mogen ze niet worden gebruikt. De normale tijd voor de celcyclus bij de gebruikte cellen en kweekomstandigheden moet bekend zijn.

##### 1.4.1.3. Bereiding van de culturen

Permanente cellijnen en stammen: cellen uit stamculturen worden met een zodanige dichtheid in een kweekmedium geënt dat de kolonies voor het oogsten niet aaneengroeien, en bij  $37^\circ\text{C}$  geïncubeerd.

Lymfocyten: met een stollingsremmer (bv. heparine) behandeld volledig bloed of geïsoleerde lymfocyten van gezonde proefpersonen worden toegevoegd aan het kweekmedium met een mitogeen (bv. fytohemagglutinine) en bij  $37^\circ\text{C}$  geïncubeerd.

##### 1.4.1.4. Metabole activering

De cellen dienen zowel met als zonder een geschikt metabool activeringssysteem aan de teststof te worden blootgesteld. Het meest gebruikte systeem is een post-mitochondriale fractie aangevuld met een cofactor (S9), verkregen uit de lever van knaagdieren die zijn behandeld met enzym-inducerende stoffen als Aroclor 1254 (6)(7)(8)(9) of een mengsel van fenobarbiton en  $\beta$ -naftoflavon (10)(11)(12).

De post-mitochondriale fractie wordt meestal gebruikt bij een concentratie van 1-10% (v/v) in het uiteindelijke medium. De omstandigheden voor het gebruik van een metabool activeringssysteem kunnen afhankelijk zijn van de aard van de geteste chemische verbinding. In sommige gevallen zal wellicht meer dan een concentratie van de post-mitochondriale fractie moeten worden gebruikt.

Een aantal ontwikkelingen, bijvoorbeeld de opbouw van genetisch aangepaste cellijnen waarin specifieke activeringsenzymen tot expressie komen, kan endogene activering mogelijk maken. Voor de keuze van de gebruikte cellijnen moet een wetenschappelijke verantwoording worden gegeven (bv. aan de hand van de relevantie van het cytochroom P450-isoenzym voor het metabolisme van de teststof).

#### 1.4.1.5. *Teststof/Bereiding*

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspenderd en eventueel vóór de behandeling van de cellen worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks aan het testsysteem worden toegediend en/of vóór de behandeling worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen van de teststof worden gebruikt.

#### 1.4.2. **Testomstandigheden**

##### 1.4.2.1. *Oplosmiddel/Medium*

Chemische reacties tussen het oplosmiddel/medium en de teststof moeten uitgesloten zijn en het oplosmiddel/medium moet verenigbaar zijn met het overleven van de cellen en de S9-activiteit. Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt. Wanneer stoffen worden getest die in water instabiel zijn, moeten de gebruikte organische oplosmiddelen watervrij zijn. Water kan door toevoeging van een moleculaire zeef worden verwijderd.

##### 1.4.2.2. *Blootstellingsconcentraties*

Bij de bepaling van de hoogste concentratie moet onder andere rekening worden gehouden met de cytotoxiciteit, de oplosbaarheid in het testsysteem en veranderingen in de pH of de osmolaliteit.

De cytotoxiciteit moet met en zonder metabole activering in het hoofdexperiment worden bepaald aan de hand van adequate indicaties omtrent de integriteit en de groei van de cellen, zoals de mate van confluentie, het aantal levensvatbare cellen of de mitotische index. Het kan nuttig zijn vooraf een apart experiment uit te voeren om de cytotoxiciteit en de oplosbaarheid te bepalen.

Er moeten ten minste drie analyseerbare concentraties worden gebruikt. Wanneer er cytotoxiciteit optreedt, moeten deze concentraties een interval van de maximale tot geen of vrijwel geen toxiciteit bestrijken; dit betekent meestal dat de concentraties niet meer dan een factor 2 tot  $\sqrt{10}$  uit elkaar mogen liggen. Bij het oogsten moet de hoogste concentratie een significante verlaging van de mate van confluentie, het aantal cellen of de mitotische index veroorzaken (voor alle parameters meer dan 50%). De mitotische index is slechts een indirecte maat voor de cytotoxische/cytostatische effecten en is afhankelijk van het tijdstip na de behandeling. De mitotische index is echter aanvaardbaar voor culturen in suspensie, waarbij andere metingen van de toxiciteit omslachtig en onpraktisch kunnen zijn. Informatie over de kinetiek van de celcyclus, zoals de gemiddelde generatietijd (GGT), kan als aanvulling worden gebruikt. De GGT is echter een algeheel gemiddelde waaruit niet altijd blijkt of er achterblijvende deelpopulaties zijn en zelfs een geringe stijging van de GGT kan samen gaan met een zeer aanzienlijke vertraging op het moment waarop de hoeveelheid afwijkingen maximaal is.

Bij stoffen met een betrekkelijk geringe cytotoxiciteit moet de maximale concentratie 5  $\mu$ l/ml, 5 mg/ml of 0,01 M (de laagste van deze drie) zijn.

Bij betrekkelijk onoplosbare stoffen die bij lagere concentraties dan de oplosbaarheidsgrens niet toxisch zijn, moet de hoogste dosis een concentratie boven de oplosbaarheidsgrens in het uiteindelijke kweekmedium aan het eind van de behandelingsperiode zijn. In sommige gevallen (bv. wanneer de toxiciteit alleen optreedt bij hogere concentraties dan de oplosbaarheidsgrens, is het raadzaam bij meer dan een concentratie met zichtbaar neerslag te testen. Het kan nuttig zijn de oplosbaarheid aan het begin en het eind van de behandeling te bepalen, aangezien de oplosbaarheid tijdens de blootstelling in het testsysteem door de aanwezigheid van bijvoorbeeld cellen, S9 of serum kan veranderen. Onoplosbaarheid kan met het blote oog worden geconstateerd. Het neerslag mag niet storen bij het scoren.

##### 1.4.2.3. *Negatieve en positieve controles*

Bij elk experiment moeten tegelijkertijd positieve en negatieve (oplosmiddel of medium) controles worden uitgevoerd, zowel met als zonder metabole activering. Wanneer metabole activering wordt gebruikt, moet de voor de positieve controle gebruikte chemische stof activering vereisen om een mutagene reactie te veroorzaken.

Voor de positieve controles moet een bekend klastoegen worden gebruikt, waarvan op het blootstellingsniveau een reproduceerbare en detecteerbare stijging ten opzichte van het achtergrondniveau kan worden verwacht om de gevoeligheid van het testsysteem aan te tonen.

De concentraties van de positieve controle moeten zodanig worden gekozen dat de effecten duidelijk zijn maar de gecodeerde objectglasjes niet onmiddellijk als zodanig herkenbaar zijn. Als positieve controle kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt:

Metabole activering	Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.
Zonder exogene metabole activering	Methylmethaansulfonaat	66-27-3	200-625-0
	Ethylmethaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
	Ethylnitrosourem	759-73-9	212-072-2
	Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
	4-Nitrocholine-N-oxide	56-57-5	200-281-1
Met exogene metabole activering	Benzo[a]pyreen	50-32-8	200-028-5
	Cyclofosfamide	50-18-0	200-015-4
	Cyclofosfamide monohydraat	6055-19-2	

Ook andere geschikte stoffen kunnen als positieve controle worden gebruikt. Waar mogelijk dient het gebruik van stoffen uit een verwante chemische klasse als positieve controle te worden overwogen.

Voor elk oogsttijdstip dienen negatieve controles in het experiment te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel of het medium wordt toegediend en die verder op dezelfde manier als de culturen met teststof worden behandeld. Daarnaast moeten er ook controles worden gebruikt waaraan niets wordt toegediend, tenzij in het verleden reeds is aangetoond dat het gekozen oplosmiddel geen schadelijke of mutagene effecten veroorzaakt.

### 1.4.3. Uitvoering

#### 1.4.3.1. Behandeling met de teststof

Delende cellen worden zowel met als zonder metabool activeringstelsel met de teststof behandeld. De behandeling van lymfocyten moet ongeveer +8 uur na de mitogene stimulering beginnen.

#### 1.4.3.2. Normaal gesproken moeten voor elke concentratie twee culturen worden gebruikt en voor culturen met negatieve/oplosmiddelcontrole wordt dit sterk aanbevolen. Wanneer aan de hand van gegevens uit het verleden kan worden aangetoond dat de verschillen tussen duploculturen minimaal zijn (13)(14), kan het gebruik van één cultuur voor elke concentratie aanvaardbaar zijn.

Bij het testen van gassen of vluchtige stoffen moet een daarvoor geschikte methode worden gevolgd, bijvoorbeeld in een gesloten kweekvat (15)(16).

#### 1.4.3.3. Oogsttijdstippen

Bij het eerste experiment moeten de cellen zowel met als zonder metabole activering gedurende drie tot zes uur aan de teststof worden blootgesteld en wordt op een tijdstip dat overeenkomt met ongeveer 1,5-maal de normale lengte van een celcyclus na het begin van de behandeling bemonsterd (12). Als op deze wijze zowel met als zonder activering negatieve resultaten worden verkregen, wordt een nieuw experiment zonder activering uitgevoerd, waarbij de behandeling wordt voortgezet totdat op een tijdstip dat overeenkomt met ongeveer 1,5-maal de normale lengte van een celcyclus wordt bemonsterd. Voor sommige stoffen gaat de detectie beter bij een behandelings/bemonsteringstijd van meer dan 1,5-maal de lengte van de celcyclus. Negatieve resultaten met metabole activering moeten per geval worden bevestigd. Wanneer bevestiging van negatieve resultaten niet nodig wordt geacht, moet hiervoor een motivering worden gegeven.

#### 1.4.3.4. Chromosoompreparaten

De celculturen worden meestal gedurende één tot drie uur vóór het oogsten behandeld met Colcemid® of colchicine. Elke celcultuur wordt afzonderlijk geoogst en behandeld voor het maken van chromosoompreparaten. Dit houdt in dat de cellen een hypotone behandeling krijgen, gevolgd door fixatie en kleuring.

#### 1.4.3.5. Analyse

Alle objectglasjes, ook die van de positieve en negatieve controles, worden vóór de microscopische analyse onafhankelijk gecodeerd. Aangezien bij de fixatie vaak een gedeelte van de metafasecellen breekt, waarbij chromosomen verloren gaan, moeten de gescoorde cellen voor alle celtypes het modale aantal  $\pm 2$  centromeren bevatten. Per concentratie en controle moeten minimaal 200 goed gespreide metafasen worden gescoord, indien van toepassing gelijkelijk verdeeld over de duplobepalingen. Wanneer een groot aantal afwijkingen wordt geconstateerd, kan dit aantal worden verlaagd.

Hoewel de test bedoeld is om structurele chromosoomafwijkingen op te sporen, is het belangrijk dat bij waarneming van polyploidie en endoreduplicatie ook deze verschijnselen worden geregistreerd.

## 2. GEGEVENS

### 2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

Aangezien de cel bij dit experiment de eenheid is, moet het percentage cellen met één of meer structurele chromosoomafwijkingen worden bepaald. Er moet een overzicht worden gegeven van de verschillende soorten structurele chromosoomafwijkingen met de aantallen en de frequentie waarmee ze in de behandelde en controleculturen voorkomen. Hiaten worden apart geregistreerd en gerapporteerd, maar worden meestal niet in de totale frequentie van de afwijkingen opgenomen.

Gelijktijdige metingen van de cytotoxiciteit voor alle behandelde en negatieve controleculturen bij de hoofdexperimenten dienen ook te worden geregistreerd.

De gegevens moeten voor elke cultuur apart worden verstrekt. Daarnaast moet er een overzicht van alle gegevens in tabelvorm worden samengesteld.

Een duidelijk positieve reactie hoeft niet te worden bevestigd. Bij onduidelijke resultaten moet nader onderzoek worden gedaan, bij voorkeur onder gewijzigde experimentele omstandigheden. De noodzakelijke bevestiging van negatieve resultaten is al onder punt 1.4.3.3. besproken. Bij vervolggexperimenten dient wijziging van parameters te worden overwogen om de bepaling uit te breiden tot een bredere scala van omstandigheden. Parameters die voor wijziging in aanmerking komen zijn bijvoorbeeld de concentratie-intervallen en de omstandigheden bij metabole activering.

### 2.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Er zijn verschillende criteria om tot een positief resultaat te besluiten, zoals een concentratieafhankelijke of een reproduceerbare stijging van het aantal cellen met chromosoomafwijkingen. In eerste instantie moet naar de biologische relevantie van de resultaten worden gekeken. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt (3)(13). Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn.

Een stijging van het aantal polyploide cellen kan erop wijzen dat de teststof in staat is mitotische processen te remmen en numerieke chromosoomafwijkingen te induceren. Een stijging van het aantal cellen met endoreduplicatie van chromosomen kan erop wijzen dat de teststof in staat is de voortgang van de celcyclus te remmen (17)(18).

Indien de resultaten voor een teststof niet aan bovenstaande criteria voldoen, wordt de stof in dit systeem als niet-mutageen beschouwd.

Hoewel de meeste experimenten duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt herhaald, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de in-vitrotest op chromosoomafwijkingen wijzen erop dat de teststof in gekweekte somatische zoogdiercellen structurele chromosoomafwijkingen induceert. Negatieve resultaten wijzen erop dat de stof onder de testomstandigheden in gekweekte somatische zoogdiercellen geen chromosoomafwijkingen induceert.

### 3. **RAPPORTAGE**

#### TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Oplosmiddel/Medium:

- motivering voor de keuze van het medium:
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend.

Cellen:

- aard en herkomst van de cellen;
- kenmerken van het karyotype en bruikbaarheid van het gebruikte celtype;
- afwezigheid van mycoplasma, indien van toepassing;
- informatie over de lengte van de celcyclus;
- geslacht van de bloeddonors, volledig bloed of geïsoleerde lymfocyten, gebruikt mitogeen;
- aantal overentingen, indien van toepassing;
- methoden om de celcultuur in leven te houden, indien van toepassing;
- modaal aantal chromosomen.

Testomstandigheden:

- naam van de metafase-stopper, gebruikte concentratie en blootstellingsduur;
- achtergrond voor de keuze van de concentraties en het aantal culturen, bijvoorbeeld gegevens over de cytotoxiciteit en beperkte oplosbaarheid, indien beschikbaar;
- samenstelling van het medium en CO<sub>2</sub>-concentratie, indien van toepassing;
- concentratie van de teststof;
- toegevoegd volume medium en teststof;
- incubatietemperatuur;
- incubatietijd;
- duur van de behandeling;
- celdichtheid bij het enten, indien van toepassing;
- aard en samenstelling van het metabool activeringssysteem, met inbegrip van aanvaardbaarheidscriteria;
- positieve en negatieve controles;
- methoden voor de bereiding van de objectglaasjes;
- criteria voor het scoren van afwijkingen;



- aantal geanalyseerde metafases;
- methoden voor de meting van de toxiciteit;
- criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is.

Resultaten:

- tekenen van toxiciteit, bijvoorbeeld de mate van confluentie, gegevens over de celcyclus, het aantal cellen en de mitotische index;
- neerslagverschijnselen;
- gegevens over de pH en de osmolaliteit van het behandelingsmedium, indien bepaald;
- definitie voor afwijkingen, met inbegrip van hiaten;
- het aantal cellen met chromosoomafwijkingen en de aard van de chromosoomafwijkingen, afzonderlijk vermeld voor elke behandelde en controlecultuur;
- veranderingen in de ploïdie, indien waargenomen;
- indien mogelijk het verband tussen dosis en respons;
- eventuele statistische analyses;
- gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles;
- gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

#### 4. REFERENTIES

- (1) Evans, H.J. (1976). Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens. In: Chemical mutagens. Principles and Methods for their Detection, Vol. 4. Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.
- (2) Ishidate, M.Jr. and Sofuni, T. (1985). The in Vitro Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture. In: Progress in Mutation Research, Vol. 5, Ashby, J. et al., (Eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 427-432.
- (3) Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G.H., Resnick, M.A., Anderson, G. and Zeiger, E. (1978). Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environ. Molec. Mutagen* 10 (suppl.10), pp. 1-175.
- (4) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.* 257, pp. 147-204.
- (5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K., (1992). Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268, pp. 297-305.
- (6) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.
- (7) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.

- (8) Natarajan, A.T., Bates, A.D., van Buul, P.P.W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System In Vitro, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37, pp. 83-90.
  - (9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix In Vitro. *Mutation Res.*, 66, pp. 277-290.
  - (10) Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in In Vitro Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.
  - (11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds) *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
  - (12) Galloway, S.M., Aardema, M.J., Ishidate, M.Jr., Ivett, J.L., Kirkland, D.J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994). Report from Working Group on In Vitro Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312, pp. 241-261.
  - (13) Richardson, C., Williams, D.A., Allen, J.A., Amphlett, G., Chanter, D.O. and Phillips, B. (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.
  - (14) Soper, K.A. and Galloway, S.M. (1994). Replicate Flasks are not Necessary for In Vitro Chromosome Aberration Assays in CHO Cells. *Mutation Res.*, 312, pp. 139-149.
  - (15) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, pp. 91-103.
  - (16) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels of Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795-801.
  - (17) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. *Mutation Res.*, 119, pp. 403-413.
  - (18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells. *Cancer Res.*, 43, pp. 1362-1364.
-

## „B.11. MUTAGENITEIT — IN-VIVOTEST OP CHROMOSOOMAFWIJINGEN IN BEENMERGCELLEN VAN ZOOGDIEREN

### 1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 475 van de OESO: Test op chromosoomafwijkingen in beenmergcellen van zoogdieren (1997).

#### 1.1. INLEIDING

De in-vivotest op chromosoomafwijkingen bij zoogdieren wordt gebruikt om te bepalen welke structurele chromosoomafwijkingen bij beenmergcellen van dieren, meestal knaagdieren, veroorzaken (1) (2) (3) (4). Er zijn twee soorten structurele afwijkingen: het chromosoomtype en het chromatidetype. Een toename van polyploidie kan erop wijzen dat een chemische stof numerieke afwijkingen kan veroorzaken. De meeste chemische mutagenen veroorzaken afwijkingen van het chromatidetype, maar ook het chromosoomtype komt voor. Chromosoommutaties en soortgelijke voorvallen veroorzaken veel genetische ziekten bij de mens en het lijkt er sterk op dat chromosoommutaties en soortgelijke voorvallen die veranderingen in oncogenen en tumorsuppressorgenen veroorzaken, betrokken zijn bij de inductie van kanker bij de mens en bij proefdieren.

Voor deze test worden meestal knaagdieren gebruikt. Het doelweefsel is het beenmerg aangezien dit een sterk doorbloed weefsel is en een populatie snel delende cellen bevat die gemakkelijk kunnen worden geïsoleerd en verwerkt. De methode is niet geschikt voor andere diersoorten en doelweefsels.

Deze test op chromosoomafwijkingen is bijzonder geschikt om het gevaar van mutagene effecten te evalueren, aangezien rekening kan worden gehouden met factoren die samenhangen met het metabolisme in vivo, de farmacokinetiek en de DNA-herstelsynthese, hoewel deze aspecten van soort tot soort en van weefsel tot weefsel kunnen verschillen. Een in-vivotest is ook geschikt om een in vitro gesignaleerd mutageen effect nader te onderzoeken.

Als er aanwijzingen zijn dat de teststof of een reactieve metaboliet daarvan niet in het doelweefsel terecht komt, is deze test niet geschikt.

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

#### 1.2. DEFINITIES

**Afwijking van het chromatidetype:** structurele chromosoombeschadiging waarbij breuken in individuele chromatiden ontstaan, eventueel gevolgd door recombinatie.

**Afwijking van het chromosoomtype:** structurele chromosoombeschadiging waarbij breuken in beide chromatiden op dezelfde plaats ontstaan, eventueel gevolgd door recombinatie.

**Endoreduplicatie:** een proces waarbij de kern na een S-fase met DNA-replicatie niet tot mitose overgaat, maar opnieuw een S-fase begint. Het resultaat is chromosomen met 4, 8, 16, ... chromatiden.

**Hiaat:** een achromatische beschadiging die kleiner is dan de breedte van één chromatide en waarbij de fout in de uitlijning van de chromatiden minimaal is.

**Numerieke afwijking:** een verandering in het aantal chromosomen ten opzichte van het normale aantal dat kenmerkend is voor de gebruikte cellen.

**Polyploidie:** het voorkomen van een ander veelvoud van het haploïde aantal chromosomen ( $n$ ) dan het diploïde aantal (d.w.z.  $3n$ ,  $4n$ , enz.).

**Structurele afwijking:** een verandering in de chromosoomstructuur die bij microscopisch onderzoek tijdens de metafase van de celdeling kan worden waargenomen in de vorm van deleties, fragmenten en intra- of interchromosomale uitwisselingen.

### 1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De dieren worden langs een geschikte weg aan de teststof blootgesteld en op geschikte tijdstippen na de behandeling gedood. Voordat de dieren worden gedood, worden ze behandeld met een metafasestopper (bv. colchicine of Colcemid®). Vervolgens worden chromosoompreparaten van de beenmergcellen gemaakt, die worden gekleurd; de cellen in de metafase worden geanalyseerd op chromosoomafwijkingen.

### 1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

#### 1.4.1. **Vorbereiding**

##### 1.4.1.1. *Keuze van de diersoort*

Meestal worden ratten, muizen of Chinese hamsters gebruikt, maar in principe komt elke geschikte zoogdier-soort in aanmerking. Er dient gebruik te worden gemaakt van jonge gezonde volwassen dieren van in het laboratorium gangbare stammen. Bij het begin van de studie moet het gewichtsverschil tussen de dieren zo klein mogelijk zijn en mag dit maximaal  $\pm 20\%$  van het gemiddelde gewicht van elk geslacht bedragen.

##### 1.4.1.2. *Huisvesting en voeding*

De in de algemene inleiding van deel B genoemde algemene omstandigheden worden aangehouden, maar voor de luchtvochtigheid wordt gestreefd naar 50-60%.

##### 1.4.1.3. *Vorbereiding van de dieren*

Gezonde jonge volwassen dieren worden aselekt ingedeeld in de behandelde en controlegroepen. De kooien moeten zodanig worden geplaatst dat mogelijke effecten daarvan tot een minimum worden beperkt. De dieren krijgen een unieke identificatie. Ze krijgen minimaal vijf dagen de tijd om in het laboratorium te acclimatiseren.

##### 1.4.1.4. *Bereiding van de doseringen*

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspenderd en eventueel vóór de toediening aan de dieren worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks worden toegediend of vóór de toediening worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen van de teststof worden gebruikt.

#### 1.4.2. **Testomstandigheden**

##### 1.4.2.1. *Oplosmiddel/Medium*

Het oplosmiddel/medium mag bij de gebruikte dosisniveaus geen toxische effecten veroorzaken en chemische reacties met de teststof moeten uitgesloten zijn. Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt.

##### 1.4.2.2. *Controles*

Bij elk experiment moeten tegelijkertijd positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles voor elk geslacht worden uitgevoerd. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren in de controlegroepen op identieke wijze worden behandeld als de dieren in de andere groepen.

Voor de positieve controles moet een stof worden gebruikt die in vivo structurele afwijkingen veroorzaakt op een blootstellingsniveau waarbij een detecteerbare stijging ten opzichte van het achtergrondniveau kan worden verwacht. De doseringen van de positieve controles moeten zodanig worden gekozen dat de effecten duidelijk zijn maar de gecodeerde objectglasjes niet onmiddellijk als zodanig herkenbaar zijn. Het is aanvaard-

baar de positieve controle langs een andere weg toe te dienen dan de teststof en slechts op één tijdstip te bemonsteren. Waar mogelijk kan het gebruik van stoffen uit een verwante chemische klasse als positieve controle worden overwogen. Als positieve controle kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt:

Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.
Ethylmethaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
Ethylnitrosourem	759-73-9	212-072-2
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
Cyclofosfamide	50-18-0	200-015-4
Cyclofosfamide monohydraat	6055-19-2	
Triethyleenmelamine	51-18-3	200-083-5

Voor elk bemonsteringstijdstip dienen negatieve controles in het experiment te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel of het medium wordt toegediend en die verder op dezelfde manier als de andere groepen worden behandeld, tenzij uit in het verleden uitgevoerde controles aanvaardbare gegevens beschikbaar zijn over de spreiding over de dieren en de frequentie van cellen met chromosoomafwijkingen. Als voor de negatieve controles één bemonsteringstijdstip wordt gebruikt, kan hiervoor het beste het eerste bemonsteringstijdstip worden gekozen. Daarnaast moeten er ook onbehandelde controles worden gebruikt, tenzij in het verleden of in de literatuur reeds is aangetoond dat het gekozen oplosmiddel of medium geen schadelijke of mutagene effecten veroorzaakt.

## 1.5. UITVOERING

### 1.5.1. Aantal en geslacht van de dieren

Elke behandelde en controlegroep moet minimaal vijf analyseerbare dieren per geslacht bevatten. Als er bij de uitvoering van de studie gegevens uit studies bij dezelfde soort en met dezelfde blootstellingsweg beschikbaar zijn waaruit blijkt dat er geen significante verschillen in toxiciteit tussen de geslachten zijn, is het voldoende de test bij één geslacht uit te voeren. Wanneer de blootstelling aan een chemische stof bij de mens door het geslacht wordt bepaald, zoals bijvoorbeeld bij sommige geneesmiddelen het geval is, moet de test bij dieren van het desbetreffende geslacht worden uitgevoerd.

### 1.5.2. Behandelingsschema

De teststof wordt bij voorkeur in één dosis toegediend. De dosis kan eventueel worden gesplitst, waarbij de twee porties op dezelfde dag met een interval van niet meer dan enkele uren worden toegediend, om de toediening van een groot volume te vergemakkelijken. Voor een ander doseringsschema moet een wetenschappelijke motivering worden gegeven.

De monsters worden op twee aparte tijdstippen na de behandeling op één dag genomen. Voor knaagdieren ligt het eerste bemonsteringstijdstip op 1,5 maal de normale lengte van een celcyclus (deze cyclus duurt meestal 12 tot 18 uur) na de behandeling. Aangezien de voor de opname en het metabolisme van de teststof vereiste tijd en de effecten op de kinetiek van de celcyclus gevolgen kunnen hebben voor het optimale tijdstip om chromosoomafwijkingen te detecteren, verdient het aanbeveling 24 uur na het eerste bemonsteringstijdstip opnieuw te bemonsteren. Indien het doseringsschema meer dan één dag beslaat, moet één bemonsteringstijdstip op 1,5 maal de normale lengte van een celcyclus na de laatste toediening worden gebruikt.

Voordat de dieren worden gedood, worden ze intraperitoneaal geïnjecteerd met een adequate dosis metafasestopper (bv. Colcemid<sup>®</sup> of colchicine). De dieren worden na een adequate pauze bemonsterd. Voor muizen moet er ongeveer drie tot vijf uur worden gewacht en voor Chinese hamsters ongeveer vier tot vijf uur. De cellen worden uit het beenmerg gehaald en op chromosoomafwijkingen geanalyseerd.

### 1.5.3. **Dosisniveaus**

Als er een oriënterend onderzoek wordt uitgevoerd omdat er geen bruikbare gegevens over de dosering beschikbaar zijn, moet dit in hetzelfde laboratorium gebeuren met dezelfde soort, dezelfde stam, hetzelfde geslacht en hetzelfde behandelingsschema als bij het hoofdonderzoek (5). Als er sprake is van toxiciteit, worden er voor het eerste bemonsteringstijdstip drie dosisniveaus gebruikt. Deze dosisniveaus moeten een interval van de maximale tot geen of vrijwel geen toxiciteit bestrijken. Op het latere bemonsteringstijdstip hoeft alleen de hoogste dosis te worden gebruikt. De hoogste dosis wordt gedefinieerd als de dosis die zodanige toxiciteitsverschijnselen veroorzaakt dat er bij hogere doses met hetzelfde doseringsschema waarschijnlijk sterfte zal optreden. Stoffen met een specifieke biologische activiteit bij lage niet-toxische doses (zoals hormonen en mitogenen) kunnen een uitzondering vormen op deze criteria om de dosering te bepalen en moeten per geval worden beoordeeld. De hoogste dosis kan ook worden gedefinieerd als een dosis die enigerlei aanwijzing van toxiciteit voor het beenmerg oplevert (bv. een daling van de mitotische index met meer dan 50%).

### 1.5.4. **Limiettest**

Als een test met één dosis van minimaal 2000 mg/kg lichaamsgewicht, in één keer of in twee porties op dezelfde dag toegediend, geen waarneembare toxische effecten veroorzaakt en op basis van gegevens over stoffen met een verwante structuur geen genotoxiciteit te verwachten valt, zal het wellicht niet nodig zijn een volledig onderzoek met drie dosisniveaus uit te voeren. Voor studies met een langere duur is de limietdosis 2000 mg/kg lichaamsgewicht/dag bij toediening gedurende maximaal 14 dagen en 1000 mg/kg lichaamsgewicht/dag bij toediening gedurende meer dan 14 dagen. Op grond van gegevens omtrent de verwachte blootstelling van de mens kan het gebruik van een hoger dosisniveau bij de limiettest nodig worden geacht.

### 1.5.5. **Toediening van de doses**

De teststof wordt meestal met behulp van een maagsonde of een geschikte intubatiecanule of door intraperitoneale injectie toegediend. Ook andere toedieningswegen kunnen aanvaardbaar zijn, als daarvoor een motivering kan worden gegeven. Het maximale volume vloeistof dat in één keer met een sonde of injectie kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het proefdier. Het volume mag niet groter zijn dan 2 ml/100 g lichaamsgewicht. Voor het gebruik van grotere volumes moet een motivering worden gegeven. Behalve bij prikkelende of bijtende stoffen, die in hogere concentraties meestal heviger effecten veroorzaken, moeten volumeverschillen tot een minimum worden beperkt door de concentratie aan te passen, zodat op alle dosisniveaus hetzelfde volume kan worden gebruikt.

### 1.5.6. **Chromosoompreparaten**

Onmiddellijk nadat het dier is gedood wordt beenmerg verwijderd, in een hypotone oplossing gebracht en gefixeerd. De cellen worden vervolgens op objectglaasjes uitgesmeerd en gekleurd.

### 1.5.7. **Analyse**

Als maat voor de cytotoxiciteit wordt in ten minste 1000 cellen per dier voor alle behandelde dieren (ook de positieve controles) en onbehandelde dieren voor de negatieve controle de mitotische index bepaald.

Voor elk dier worden minimaal 100 cellen geanalyseerd. Wanneer een groot aantal afwijkingen wordt geconstateerd, kan dit aantal worden verlaagd. Alle objectglaasjes, ook die van de positieve en negatieve controles, worden vóór de microscopische analyse onafhankelijk gecodeerd. Aangezien bij de bereiding van de objectglaasjes vaak een gedeelte van de metafasecellen breekt, waarbij chromosomen verloren gaan, moeten de gescoorde cellen  $2n \pm 2$  centromeren bevatten.

## 2. **GEGEVENS**

### 2.1. **BEHANDELING VAN DE RESULTATEN**

De gegevens moeten voor elk dier apart in tabelvorm worden verstrekt. De eenheid bij dit experiment is het dier. Voor elk dier moet het aantal gescoorde cellen, het aantal afwijkingen per cel en het percentage cellen met een of meer structurele chromosoomafwijkingen worden bepaald. Er moet een overzicht worden gegeven van de verschillende soorten structurele chromosoomafwijkingen met de aantallen en de frequentie waarmee ze in de behandelde en controlegroepen voorkomen. Hiaten worden apart geregistreerd en gerapporteerd maar meestal niet in de totale frequentie van de afwijkingen opgenomen. Als er geen aanwijzingen zijn voor verschillen in reactie tussen de geslachten, kunnen de gegevens van beide geslachten voor de statistische analyse worden gecombineerd.

Er zijn verschillende criteria om tot een positief resultaat te besluiten, zoals een dosisafhankelijke stijging van het relatieve aantal cellen met chromosoomafwijkingen of een duidelijke stijging van het aantal cellen met afwijkingen in één dosisgroep bij één bemonsteringstijd. In eerste instantie moet naar de biologische relevantie van de resultaten worden gekeken. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt (6). Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn. Bij onduidelijke resultaten moet nader onderzoek worden gedaan, bij voorkeur onder gewijzigde experimentele omstandigheden.

Een toename van polyploidie kan erop wijzen dat de teststof in staat is numerieke chromosoomafwijkingen te induceren. Een toename van endoreduplicatie kan erop wijzen dat de teststof in staat is de voortgang van de celcyclus te remmen (7)(8).

Indien de resultaten voor een teststof niet aan bovenstaande criteria voldoen, wordt de stof bij deze test als niet-mutageen beschouwd.

Hoewel de meeste experimenten duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt uitgevoerd, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de in-vivotest op chromosoomafwijkingen wijzen erop dat een stof in het beenmerg van de geteste soort chromosoomafwijkingen induceert. Negatieve resultaten wijzen erop dat de stof onder de testomstandigheden in het beenmerg van de geteste soort geen chromosoomafwijkingen induceert.

De waarschijnlijkheid dat de teststof of de metabolieten daarvan in de grote bloedsomloop of specifiek het doelweefsel terechtkomen (systemische toxiciteit), dient te worden besproken.

### 3. **RAPPORTAGE**

#### TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Oplosmiddel/Medium:

- motivering voor de keuze van het medium;
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend.

Proefdieren:

- gebruikte soort/stam;
- aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;
- herkomst, huisvesting, voeding, enz.;
- het gewicht van elk dier aan het begin van de test, met vermelding van de spreiding, het gemiddelde en de standaardafwijking van het lichaamsgewicht voor elke groep.

Testomstandigheden:

- positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles;
- gegevens uit het oriënterend onderzoek, indien dit is uitgevoerd;
- achtergrond voor de keuze van de dosisniveaus;
- gegevens over de bereiding van de teststof;

- gegevens over de toediening van de teststof;
- achtergrond voor de keuze van de toedieningsweg;
- methoden om na te gaan of de teststof in de grote bloedsomloop of het doelweefsel is terechtgekomen, indien van toepassing;
- omrekening van de concentratie van de teststof in het voer/drinkwater (in ppm) in de dosis (in mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing;
- gegevens over de kwaliteit van het voer en het drinkwater;
- een gedetailleerde beschrijving van het behandelings- en bemonsteringsschema;
- methoden voor de meting van de toxiciteit;
- naam van de metafasestopper, gebruikte concentratie en blootstellingsduur;
- methoden voor de bereiding van de objectglaasjes;
- criteria voor het scoren van afwijkingen;
- aantal geanalyseerde cellen per dier;
- criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is.

#### Resultaten:

- tekenen van toxiciteit;
- mitotische index;
- aard en aantal van de afwijkingen, afzonderlijk vermeld voor elk dier;
- totaal aantal afwijkingen per groep, met vermelding van het gemiddelde en de standaardafwijking;
- aantal cellen met afwijkingen per groep, met vermelding van het gemiddelde en de standaardafwijking;
- veranderingen in de ploïdie, indien waargenomen;
- indien mogelijk het verband tussen dosis en respons;
- eventuele statistische analyses;
- gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve controles;
- gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve controles, met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking;
- gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde positieve controles.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

#### 4. REFERENTIES

- (1) Adler, I.D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*. S. Venitt and J.M. Parry (Eds). IRL Press, Oxford, Washington D.C., pp. 275-306.
- (2) Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A.F. and Shelby, M. (1987). Mammalian In Vivo Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. *Mutation Res.*, 189, pp. 157-165.



- (3) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D.G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990). In Vivo Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
  - (4) Tice, R.R., Hayashi, M., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Holden, H.E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F.B., Pacchierotti, F., Preston, R.J., Romagna, F., Simada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). Report from the Working Group on the in Vivo Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. *Mutation Res.*, 312, pp. 305-312.
  - (5) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in In Vivo Mutagenicity Assays. *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.
  - (6) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part. III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. D.J. Kirkland, (Ed.) Cambridge University Press, Cambridge. pp. 184-232.
  - (7) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. *Mutation Res.* 119, pp. 403-413.
  - (8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells. *Cancer Res.*, 43, pp. 1362-1364.
-

## „B.12. MUTAGENITEIT — IN-VIVOMICRONUCLEUSTEST BIJ ERYTHROCYTEN VAN ZOOGDIEREN

### 1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 474 van de OESO: Micronucleustest bij erythrocyten van zoogdieren (1997).

#### 1.1. INLEIDING

De in-vivomicronucleustest bij zoogdieren wordt gebruikt om na te gaan of de teststof schade toebrengt aan de chromosomen of het mitotisch apparaat van erythroblasten door de analyse van erythrocyten die worden verkregen uit het beenmerg en/of de perifere bloedcellen van dieren, meestal knaagdieren.

De micronucleustest is bedoeld om stoffen te signaleren die cytogenetische schade veroorzaken waarbij micronuclei ontstaan met achtergebleven chromosoomfragmenten of volledige chromosomen.

Wanneer een erythroblast uit het beenmerg zich ontwikkelt tot een polychromatische erythrocyt, wordt de hoofdkern uitgestoten; wanneer een micronucleus is ontstaan, kan deze in het overigens kernloze cytoplasma achterblijven. Omdat deze cellen geen hoofdkern bevatten, zijn de micronuclei gemakkelijker zichtbaar te maken. Een stijging van de frequentie waarmee bij behandelde dieren polychromatische erythrocyten met micronuclei worden aangetroffen, wijst op chromosoombeschadiging.

Voor deze test wordt meestal het beenmerg van knaagdieren gebruikt, aangezien in dit weefsel polychromatische erythrocyten worden gevormd. Het is ook aanvaardbaar het aantal onrijpe (polychromatische) erythrocyten met micronuclei in perifere bloed te bepalen bij soorten waarvan is aangetoond dat de milt niet in staat is erythrocyten met micronuclei op te ruimen of dat de gevoeligheid om stoffen die structurele of numerieke chromosoomafwijkingen veroorzaken te detecteren afdoende is. Micronuclei kunnen aan de hand van een aantal criteria worden onderscheiden, bijvoorbeeld op grond van de aan- of afwezigheid van een kinetochoor- of centromeer-DNA in de micronuclei. Het belangrijkste eindpunt is de frequentie van onrijpe (polychromatische) erythrocyten met micronuclei. Het aantal rijpe (normochromatische) erythrocyten in het perifere bloed met micronuclei, bepaald bij een bekend aantal rijpe erythrocyten, kan ook als eindpunt van de bepaling worden gebruikt wanneer de dieren gedurende ten minste vier weken ononderbroken worden behandeld.

Deze in-vivomicronucleustest bij zoogdieren is bijzonder geschikt om het gevaar van mutagene effecten te evalueren, aangezien rekening kan worden gehouden met factoren die samenhangen met het metabolisme in vivo, de farmacokinetiek en de DNA-herstelsynthese, hoewel deze aspecten van soort tot soort, van weefsel tot weefsel en voor de verschillende genetische eindpunten kunnen verschillen. Een in-vivobepaling is ook geschikt om een in vitro gesignaleerd mutageen effect nader te onderzoeken.

Als er aanwijzingen zijn dat de teststof of een reactieve metabool daarvan niet in het doelweefsel terechtkomt, is deze test niet geschikt.

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

#### 1.2. DEFINITIES

**Centromeer (kinetochoor):** het deel of de delen van een chromosoom waar tijdens de celdeling de spoeldraden aan vastzitten, zodat de verplaatsing van de dochterchromosomen naar de polen van de dochtercellen regelmatig kan verlopen.

**Micronucleus:** een kleine kern die buiten en naast de hoofdkern van cellen tijdens de telofase van de mitose (meiose) ontstaat door achtergebleven chromosoomfragmenten of volledige chromosomen.

**Normochromatische erythrocyt:** een rijpe erythrocyt zonder ribosomen die van onrijpe polychromatische erythrocyten kan worden onderscheiden door de selectieve kleuring van ribosomen.

**Polychromatische erythrocyt:** een onrijpe erythrocyt in een tussentijdse ontwikkelingsfase die nog ribosomen bevat en derhalve van rijpe normochromatische erythrocyten kan worden onderscheiden door de selectieve kleuring van ribosomen.

### 1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De dieren worden langs een geschikte weg aan de teststof blootgesteld. Als beenmerg wordt gebruikt, worden de dieren op geschikte tijdstippen na de behandeling gedood, wordt het beenmerg verwijderd en worden er preparaten gemaakt die worden gekleurd (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7). Wanneer perifeer bloed wordt gebruikt, wordt op geschikte tijdstippen na de behandeling bloed afgenomen en worden er uitstrijkpreparaten gemaakt die worden gekleurd (4)(8)(9)(10). Bij studies met perifeer bloed moet er zo weinig mogelijk tijd verstrijken tussen de laatste blootstelling en het oogsten van de cellen. De preparaten worden onderzocht op de aanwezigheid van micronuclei.

### 1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

#### 1.4.1. **Vorbereiding**

##### 1.4.1.1. *Keuze van de diersoort*

Als beenmerg wordt gebruikt, worden muizen of ratten aanbevolen, maar in principe komt elke geschikte zoogdiersoort in aanmerking. Wanneer perifeer bloed wordt gebruikt, worden muizen aanbevolen. In principe komt elke geschikte zoogdiersoort echter in aanmerking, mits het een soort is waarvan de milt niet in staat is erythrocyten met micronuclei op te ruimen of een soort waarvan is aangetoond dat de gevoeligheid om stoffen die structurele of numerieke chromosoomafwijkingen veroorzaken te detecteren afdoende is. Er dient gebruik te worden gemaakt van jonge gezonde dieren van in het laboratorium gangbare stammen. Bij het begin van de studie moet het gewichtsverschil tussen de dieren zo klein mogelijk zijn en mag dit maximaal  $\pm 20\%$  van het gemiddelde gewicht van elk geslacht bedragen.

##### 1.4.1.2. *Huisvesting en voeding*

De in de algemene inleiding van deel B genoemde algemene omstandigheden worden aangehouden, maar voor de luchtvochtigheid wordt gestreefd naar 50-60 %.

##### 1.4.1.3. *Vorbereiding van de dieren*

Gezonde jonge volwassen dieren worden aselekt ingedeeld in de behandelde en controlegroepen. De dieren krijgen een unieke identificatie. Ze krijgen minimaal vijf dagen de tijd om in het laboratorium te acclimatiseren. De kooien moeten zodanig worden geplaatst dat mogelijke effecten daarvan tot een minimum worden beperkt.

##### 1.4.1.4. *Bereiding van de doseringen*

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspenderd en eventueel vóór de toediening aan de dieren worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks worden toegediend of vóór de toediening worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen van de teststof worden gebruikt.

#### 1.4.2. **Testomstandigheden**

##### 1.4.2.1. *Oplosmiddel/Medium*

Het oplosmiddel/medium mag bij de gebruikte dosisniveaus geen toxische effecten veroorzaken en chemische reacties met de teststof moeten uitgesloten zijn. Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten referentiegegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt.

##### 1.4.2.2. *Controles*

Bij elk experiment moeten tegelijkertijd positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles voor elk geslacht worden uitgevoerd. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren in de controlegroepen op identieke wijze worden behandeld als de dieren in de andere groepen.

Voor de positieve controles moet een stof worden gebruikt die in vivo micronuclei veroorzaakt op een blootstellingsniveau waarbij een detecteerbare stijging ten opzichte van het achtergrondniveau kan worden verwacht. De doseringen van de positieve controles moeten zodanig worden gekozen dat de effecten duidelijk zijn maar de gecodeerde objectglasjes niet onmiddellijk als zodanig herkenbaar zijn. Het is aanvaardbaar de positieve controle langs een andere weg toe te dienen dan de teststof en slechts op één tijdstip te bemonsteren. Waar mogelijk kan bovendien het gebruik van stoffen uit een verwante chemische klasse als positieve controle worden overwogen. Als positieve controle kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt:

Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.
Ethylmethaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
N-Ethyl-N-nitrosouream	759-73-9	212-072-2
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
Cyclofosfamide	50-18-0	200-015-4
Cyclofosfamide monohydraat	6055-19-2	
Triethyleenmelamine	51-18-3	200-083-5

Voor elk bemonsteringstijdstip dienen negatieve controles in het experiment te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel of het medium wordt toegediend en die verder op dezelfde manier als de andere groepen worden behandeld, tenzij uit in het verleden uitgevoerde controles aanvaardbare gegevens beschikbaar zijn over de spreiding over de dieren en de frequentie van cellen met micronuclei. Als voor de negatieve controles één bemonsteringstijdstip wordt gebruikt, kan hiervoor het beste het eerste bemonsteringstijdstip worden gekozen. Daarnaast moeten er ook onbehandelde controles worden gebruikt, tenzij in het verleden of in de literatuur reeds is aangetoond dat het gekozen oplosmiddel of medium geen schadelijke of mutagene effecten veroorzaakt.

Als perifeer bloed wordt gebruikt, kan een monster dat vóór de behandeling wordt genomen ook aanvaardbaar zijn als gelijktijdige negatieve controle, maar alleen wanneer het gaat om een korte studie met perifeer bloed (bv. één tot drie behandelingen) en het resultaat binnen het verwachte interval door de in het verleden uitgevoerde controle ligt.

## 1.5. UITVOERING

### 1.5.1. Aantal en geslacht van de dieren

Elke behandelde en controlegroep moet minimaal vijf analyseerbare dieren per geslacht bevatten (11). Als er bij de uitvoering van de studie gegevens uit studies bij dezelfde soort en met dezelfde blootstellingsweg beschikbaar zijn waaruit blijkt dat er geen significante verschillen in toxiciteit tussen de geslachten zijn, is het voldoende de test bij één geslacht uit te voeren. Wanneer de blootstelling aan een chemische stof bij de mens door het geslacht wordt bepaald, zoals bijvoorbeeld bij sommige geneesmiddelen het geval is, moet de test bij dieren van het desbetreffende geslacht worden uitgevoerd.

### 1.5.2. Behandelingsschema

Er kan geen standaardbehandelingsschema (d.w.z. één, twee of meer behandelingen met een interval van 24 uur) worden aanbevolen. De monsters van verlengde doseringsschema's zijn aanvaardbaar, mits een positief effect voor deze studie is aangetoond of, voor een negatieve studie, mits toxiciteit is aangetoond of de limietdosis is gebruikt, en de toediening tot het bemonsteringstijdstip is voortgezet. De dosis kan eventueel worden gesplitst, waarbij de twee porties op dezelfde dag met een interval van niet meer dan enkele uren worden toegediend, om de toediening van een groot volume te vergemakkelijken.

De test kan op twee manieren worden uitgevoerd:

- De dieren worden eenmaal met de teststof behandeld. Beenmergmonsters worden ten minste tweemaal genomen, de eerste keer niet eerder dan 24 uur na de behandeling en de laatste keer uiterlijk 48 uur na de behandeling, met een afdoende interval tussen de monsters. Voor het gebruik van een bemonsteringstijdstip binnen 24 uur na de behandeling moet een motivering worden gegeven. Monsters van perifeer

bloed worden ten minste tweemaal genomen, de eerste keer niet eerder dan 36 uur na de behandeling, met een afdoende interval na het eerste monster, en de laatste keer uiterlijk 72 uur na de behandeling. Wanneer op één bemonsteringstijdstip een positieve reactie wordt gesignaleerd, behoeven er geen verdere monsters meer te worden genomen.

- b) Als twee of meer dagelijkse behandelingen worden gebruikt (bv. twee of meer behandelingen met een interval van 24 uur), moet de bemonstering voor het beenmerg eenmaal gebeuren tussen 18 en 24 uur na de laatste behandeling en voor het perifere bloed eenmaal tussen 36 en 48 uur na de laatste behandeling (12).

Indien dit nuttig is, kunnen daarnaast ook andere bemonsteringstijdstippen worden gebruikt.

### 1.5.3. Dosisniveaus

Als er een oriënterend onderzoek wordt uitgevoerd omdat er geen bruikbare gegevens over de dosering beschikbaar zijn, moet dit in hetzelfde laboratorium gebeuren met dezelfde soort, dezelfde stam, hetzelfde geslacht en hetzelfde behandelingsschema als bij het hoofdonderzoek (13). Als er sprake is van toxiciteit, worden er voor het eerste bemonsteringstijdstip drie dosisniveaus gebruikt. Deze dosisniveaus moeten een interval van de maximale tot geen of vrijwel geen toxiciteit bestrijken. Op het latere bemonsteringstijdstip behoeft alleen de hoogste dosis te worden gebruikt. De hoogste dosis wordt gedefinieerd als de dosis die zodanige toxiciteitsverschijnselen veroorzaakt dat er bij hogere doses met hetzelfde doseringsschema waarschijnlijk sterfte zal optreden. Stoffen met een specifieke biologische activiteit bij lage niet-toxische doses (zoals hormonen en mitogenen) kunnen een uitzondering vormen op deze criteria om de dosering te bepalen en moeten per geval worden beoordeeld. De hoogste dosis kan ook worden gedefinieerd als een dosis die enigerlei aanwijzing van toxiciteit voor het beenmerg oplevert (bv. een daling van de verhouding tussen het aantal onrijpe erythrocyten en het totale aantal erythrocyten in het beenmerg of het perifere bloed).

### 1.5.4. Limiettest

Als een test met één dosis van minimaal 2 000 mg/kg lichaamsgewicht, in één keer of in twee porties op dezelfde dag toegediend, geen waarneembare toxische effecten veroorzaakt en op basis van gegevens over stoffen met een verwante structuur geen genotoxiciteit te verwachten valt, zal het wellicht niet nodig zijn een volledig onderzoek met drie dosisniveaus uit te voeren. Voor studies met een langere duur is de limietdosis 2 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag bij toediening gedurende maximaal 14 dagen en 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag bij toediening gedurende meer dan 14 dagen. Op grond van gegevens omtrent de verwachte blootstelling van de mens kan het gebruik van een hoger dosisniveau bij de limiettest nodig worden geacht.

### 1.5.5. Toediening van de doses

De teststof wordt meestal met behulp van een maagsonde of een geschikte intubatiecanule of door intraperitoneale injectie toegediend. Ook andere toedieningswegen kunnen aanvaardbaar zijn, als daarvoor een motivering kan worden gegeven. Het maximale volume vloeistof dat in één keer met een sonde of injectie kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het proefdier. Het volume mag niet groter zijn dan 2 ml/100 g lichaamsgewicht. Voor het gebruik van grotere volumes moet een motivering worden gegeven. Behalve bij prikkelende of bijtende stoffen, die in hogere concentraties meestal heviger effecten veroorzaken, moeten volumever schillen tot een minimum worden beperkt door de concentratie aan te passen, zodat op alle dosisniveaus hetzelfde volume kan worden gebruikt.

### 1.5.6. Beenmerg/bloedpreparaten

De beenmergcellen worden meestal volgens gangbare methoden uit het dijbeen of scheenbeen van pas gedode dieren verwijderd, geprepareerd en gekleurd. Perifeer bloed wordt uit de staartader of een ander geschikt bloedvat afgenomen. De bloedcellen worden onmiddellijk supravitaal gekleurd (8)(9)(10) of er wordt een uitsrijkpreparaat gemaakt dat vervolgens wordt gekleurd. Door het gebruik van een DNA-specifieke kleurstof (bv. acridine oranje (14) of Hoechst 33258 plus pyronine-Y (15)) kunnen sommige artefacten die zich bij het gebruik van niet voor DNA specifieke kleurstoffen kunnen voordoen, worden voorkomen. Dit neemt niet weg dat ook klassieke kleurstoffen (zoals Giemsa) kunnen worden gebruikt. Ook andere systemen (zoals cellulosekolommen om cellen die een kern bevatten te verwijderen (16)) kunnen worden gebruikt, mits is aangetoond dat deze methoden geschikt zijn voor micronucleuspreparaten in het laboratorium.

### 1.5.7. Analyse

Voor elk dier wordt de verhouding tussen het aantal onrijpe erythrocyten en het totale aantal (onrijpe + rijpe) erythrocyten bepaald door in totaal voor het beenmerg ten minste 200 erythrocyten en voor het perifere bloed ten minste 1 000 erythrocyten te tellen (17). Alle objectglasjes, ook die van de negatieve en positieve contro-

les, worden vóór de microscopische analyse onafhankelijk gecodeerd. Voor de bepaling van de frequentie waarmee onrijpe erythrocyten met micronuclei voorkomen, worden ten minste 2 000 rijpe erythrocyten per dier gescoord. Aanvullende informatie kan worden verkregen door rijpe erythrocyten op micronuclei te scoren. Bij de analyse van de objectglaasjes mag de verhouding tussen het aantal onrijpe erythrocyten en het totale aantal erythrocyten niet lager dan 20% van de controlewaarde zijn. Wanneer de dieren onafgebroken gedurende ten minste vier weken zijn behandeld, kunnen ook ten minste 2 000 rijpe erythrocyten per dier op het voorkomen van micronuclei worden gescoord. Geautomatiseerde analysesystemen (beeldanalyse en celsuspensie-doorstroomcytometrie) zijn aanvaardbaar als alternatief voor handmatige beoordeling, indien ze afdoende zijn gemotiveerd en gevalideerd.

## 2. GEGEVENS

### 2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

De gegevens moeten voor elke dier apart in tabelvorm worden verstrekt. De eenheid bij dit experiment is het dier. Voor elk onderzocht dier worden het aantal gescoorde onrijpe erythrocyten, het aantal onrijpe erythrocyten met micronuclei en het aantal onrijpe erythrocyten op het totale aantal apart vermeld. Wanneer de dieren onafgebroken gedurende ten minste vier weken zijn behandeld, moeten de gegevens over rijpe erythrocyten ook worden vermeld als deze zijn verzameld. Voor elk dier worden de verhouding tussen het aantal onrijpe erythrocyten en het totale aantal erythrocyten en, indien dit zinnig wordt geacht, het percentage van de erythrocyten met micronuclei vermeld. Als er geen aanwijzingen zijn voor verschillen in reactie tussen de geslachten, kunnen de gegevens van beide geslachten voor de statistische analyse worden gecombineerd.

### 2.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Er zijn verschillende criteria om tot een positief resultaat te besluiten, zoals een dosisafhankelijke stijging van het aantal cellen met micronuclei of een duidelijke stijging van het aantal cellen met micronuclei in één dosiagroep bij één bemonsteringstijd. In eerste instantie moet naar de biologische relevantie van de resultaten worden gekeken. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt (18)(19). Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn. Bij onduidelijke resultaten moet nader onderzoek worden gedaan, bij voorkeur onder gewijzigde experimentele omstandigheden.

Indien de resultaten voor een teststof niet aan bovenstaande criteria voldoen, wordt de stof bij deze test als niet-mutageen beschouwd.

Hoewel de meeste experimenten duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt herhaald, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de micronucleustest wijzen erop dat de stof micronuclei induceert die ontstaan door chromosoombeschadigingen of beschadiging van het mitotisch apparaat in de erytroblasten van de geteste soort. Negatieve resultaten wijzen erop dat de stof onder de testomstandigheden geen micronuclei in de onrijpe erythrocyten van de geteste soort veroorzaakt.

De waarschijnlijkheid dat de teststof of de metabolieten daarvan in de grote bloedsomloop of specifiek het doelweefsel terechtkomen (systemische toxiciteit), dient te worden besproken.

## 3. RAPPORTAGE

### TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Oplosmiddel/Medium:

- motivering voor de keuze van het medium:
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend.

#### Proefdieren:

- gebruikte soort/stam;
- aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;
- herkomst, huisvesting, voeding enz.;
- het gewicht van elk dier aan het begin van de test, met vermelding van de spreiding, het gemiddelde en de standaardafwijking van het lichaamsgewicht voor elke groep.

#### Testomstandigheden:

- gegevens over positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles;
- gegevens uit het oriënterend onderzoek, indien dit is uitgevoerd;
- achtergrond voor de keuze van de dosisniveaus;
- gegevens over de bereiding van de teststof;
- gegevens over de toediening van de teststof;
- achtergrond voor de keuze van de toedieningsweg;
- methoden om na te gaan of de teststof in de grote bloedsomloop of het doelweefsel is terechtgekomen, indien van toepassing;
- omrekening van de concentratie van de teststof in het voer/drinkwater (in ppm) in de dosis (in mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing;
- gegevens over de kwaliteit van het voer en het drinkwater;
- een gedetailleerde beschrijving van het behandelings- en bemonsteringsschema;
- methoden voor de bereiding van de objectglaasjes;
- methoden voor de meting van de toxiciteit;
- criteria voor het scoren van onrijpe erythrocyten met micronuclei;
- aantal geanalyseerde cellen per dier;
- criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is.

#### Resultaten:

- tekenen van toxiciteit;
- verhouding tussen het aantal onrijpe erythrocyten en het totale aantal erythrocyten;
- aantal onrijpe erythrocyten met micronuclei, afzonderlijk vermeld voor elk dier;
- gemiddelde  $\pm$  standaardafwijking van het aantal onrijpe erythrocyten met micronuclei per groep;
- indien mogelijk het verband tussen dosis en respons;
- statistische analyses en gevolgde methodes;
- gegevens over tegelijkertijd en in het verleden uitgevoerde negatieve controles;
- gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde positieve controles.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

- (1) Heddle, J.A. (1973). A Rapid In Vivo Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, pp. 187-190.
- (2) Schmid, W. (1975). The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 9-15.
- (3) Heddle, J.A., Salamone, M.F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.G. and Newell, G.W. (1983). The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. *Mutation Res.* 123, pp. 61-118.
- (4) Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F. and Heddle, J.A. (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 Res.*, 239, pp. 29-80.
- (5) MacGregor, J.T., Schlegel, R., Choy, W.N., and Wehr, C.M. (1983). Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice. in: „Developments in Science and Practice of Toxicology”, Ed. A.W. Hayes, R.C. Schnell and T.S. Miya, Elsevier, Amsterdam, pp. 555-558.
- (6) MacGregor, J.T., Heddle, J.A. Hite, M., Margolin, G.H., Ramel, C., Salamone, M.F., Tice, R.R., and Wild, D. (1987) Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes. *Mutation Res.* 189, pp. 103-122.
- (7) MacGregor, J.T., Wehr, C.M., Henika, P.R., and Shelby, M.E. (1990). The in vivo Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies. *Fund. Appl. Toxicol.* 14, pp. 513-522.
- (8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990). The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coates Slides. *Mutation Res.*, 245, pp. 245-249.
- (9) 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 by CSGMT/JEMMS. MMS. *Mutation Res.*, 278, pp. 83-98.
- (10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS. MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan)(1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis*, 10, pp. 153-159.
- (11) Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blackey, D.H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr.F.B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). In Vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. *Mutation Res.*, 312, pp. 293-304.
- (12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995). An optimal, generalised sampling time of  $30 \pm 6$  h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis*, 10, pp. 313-319.
- (13) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Rochold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in In vivo Mutagenicity Assays. *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.
- (14) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Res.*, 120, pp. 241-247.
- (15) MacGregor, J.T., Wehr, C.M. and Langlois, R.G. (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y., *Mutation Res.*, 120, pp. 269-275.
- (16) Romagna, F. and Staniforth, C.D. (1989). The automated bone marrow micronucleus test. *Mutation Res.*, 213, pp. 91-104.
- (17) Gollapudi, B. and McFadden, L.G. (1995). Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutation Res.*, 347, pp. 97-99.
- (18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). In Vivo Cytogenetics Assay. In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I, revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
- (19) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III. Cambridge University Press. Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.



## 1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 471 van de OESO: Terugmutatietest met bacteriën (1997).

### 1.1. INLEIDING

Bij de terugmutatietest met bacteriën worden aminozuurafhankelijke stammen van *Salmonella typhimurium* en *Escherichia coli* gebruikt voor de detectie van puntmutaties, waarbij vervanging, toevoeging of deletie van een of enkele DNA-basenparen optreedt (1)(2)(3). Deze terugmutatietest met bacteriën is gebaseerd op het beginsel dat mutaties worden gedetecteerd die ertoe leiden dat in de teststammen aanwezige mutaties en daarmee de functionele capaciteit van de bacteriën om een essentieel aminozuur te synthetiseren worden hersteld. Deze teruggemuteerde bacteriën worden zichtbaar doordat ze kunnen groeien zonder het aminozuur dat de ouderstam nodig heeft.

Puntmutaties veroorzaken veel genetische ziekten bij de mens en het lijkt er sterk op dat puntmutaties in oncogenen en tumorsuppressorgenen van somatische cellen betrokken zijn bij het ontstaan van tumoren bij de mens en bij proefdieren. De terugmutatietest met bacteriën is snel, goedkoop en betrekkelijk gemakkelijk uit te voeren. Veel van de teststammen hebben verschillende kenmerken waardoor ze gevoeliger zijn voor de detectie van mutaties, zoals reactieve DNA-sequenties op de terugmutatieplaatsen, een verhoogde permeabiliteit van de cel voor grote moleculen en de afwezigheid van DNA-herstelsystemen of de stimulering van foutgevoelige DNA-herstelprocessen. De specificiteit van de teststammen kan enige nuttige informatie opleveren over de aard van de mutaties die door genotoxische stoffen worden geïnduceerd. Er zijn zeer veel gegevens beschikbaar over de resultaten van de terugmutatietest met bacteriën voor een grote verscheidenheid van structuren en er zijn betrouwbare methodologieën ontwikkeld voor het testen van chemische stoffen met uiteenlopende fysisch-chemische eigenschappen, waaronder ook vluchtige stoffen.

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

### 1.2. DEFINITIES

**Terugmutatietest** bij *Salmonella typhimurium* of *Escherichia coli*: een test voor de detectie van mutaties in een aminozuurafhankelijke stam (respectievelijk histidine of tryptofaan), waarbij een stam ontstaat die onafhankelijk is van een externe aminozuurbron.

**Mutageen met basenpaarvervanging**: een stof die een wijziging van een base in het DNA veroorzaakt. Bij een terugmutatietest kan dit op de plaats van de oorspronkelijke mutatie of op een andere plaats in het bacteriële genoom gebeuren.

**Mutageen met leesraamverschuiving**: een stof die invoeging of deletie van een of meer basenparen in het DNA veroorzaakt, waardoor het leesraam in het RNA wijzigt.

### 1.3. TOELICHTING

Voor de terugmutatietest met bacteriën worden prokaryote cellen gebruikt, die in bijvoorbeeld opname, metabolisme, chromosoomstructuur en DNA-herstelprocessen van zoogdiercellen verschillen. Bij in vitro uitgevoerde tests moet er meestal een exogene metabole activeringsbron worden gebruikt. Dit metabole activeringssysteem kan de omstandigheden in een zoogdiercel in vivo niet volledig nabootsen. De test levert dan ook geen directe informatie op over de potentiële mutagene en carcinogene werking van een stof bij zoogdieren.

De terugmutatietest met bacteriën wordt meestal gebruikt als een eerste screening voor een genotoxische werking en met name de inductie van puntmutaties. Op basis van een groot aantal gegevens is gebleken dat veel stoffen die bij deze test positief reageren, ook bij andere tests een mutagene werking vertonen. Er zijn voor-

beelden van mutagene stoffen die met deze test niet worden gesignaleerd; dit kan wellicht worden toegeschreven aan de specifieke aard van het gedetecteerde eindpunt, verschillen in metabole activering of verschillen in biologische beschikbaarheid. Anderzijds kunnen factoren die de gevoeligheid van de terugmutatietest met bacteriën bevorderen, leiden tot een te hoge inschatting van de mutagene werking.

De terugmutatietest met bacteriën zal wellicht niet geschikt zijn voor de beoordeling van bepaalde klassen chemische stoffen zoals sterk bactericide verbindingen (bv. bepaalde antibiotica) en stoffen waarvan vermoed wordt (of bekend is) dat ze specifiek het replicatiesysteem van zoogdiercellen storen (bv. bepaalde topoisomeraseremmers en bepaalde nucleosideanalogen). In deze gevallen zullen mutatiestests met zoogdiercellen wellicht geschikter zijn.

Hoewel veel stoffen die positief op deze test reageren, ook carcinogeen voor zoogdieren zijn, is de correlatie niet absoluut. De correlatie is afhankelijk van de chemische klasse en er zijn carcinogenen die niet met deze test worden gesignaleerd omdat ze via andere niet-genotoxische mechanismen werken of via mechanismen die in bacteriecellen ontbreken.

#### 1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Suspensies van bacteriecellen worden zowel met als zonder een exogeen metabool activeringssysteem aan de teststof blootgesteld. Bij de methode met geïntegreerde voedingsbodem worden deze suspensies met een topagar vermengd en direct op minimaal medium uitgeplaat. Bij de preïncubatiemethode wordt het behandelde mengsel geïncubeerd en vervolgens met een topagar vermengd voordat het op minimaal medium wordt uitgeplaat. Bij beide technieken worden na twee of drie dagen incuberen de terugmutantkolonies geteld en wordt dit aantal vergeleken met het aantal spontane terugmutantkolonies op controleplaten met oplosmiddel.

Er zijn verschillende procedures voor de uitvoering van de terugmutatietest met bacteriën beschreven. Het meest gebruikt worden de methode met geïntegreerde voedingsbodem (1)(2)(3)(4), de preïncubatiemethode (2)(3)(5)(6)(7)(8), de fluctuatiemethode (9)(10) en de suspensiemethode (11). Ook wijzigingen voor het testen van gassen of dampen zijn beschreven (12).

De hier beschreven procedures gelden vooral voor de methode met geïntegreerde voedingsbodem en de preïncubatiemethode. Beide zijn aanvaardbaar voor de uitvoering van experimenten zowel met als zonder metabole activering. Bij sommige stoffen verloopt de detectie efficiënter met de preïncubatiemethode. Deze stoffen behoren tot chemische klassen als alifatische nitrosamines met een korte keten, divalente metalen, aldehyden, azokleurstoffen en diazoverbindingen, pyrrolizidine-alkaloiden, allylverbindingen en nitroverbindingen (3). Tevens is het bekend dat bepaalde klassen mutagene verbindingen niet altijd met standaardprocedures als de methode met geïntegreerde voedingsbodem of de preïncubatiemethode worden gesignaleerd. Deze moeten als „speciale gevallen” worden beschouwd en voor de signalering daarvan wordt sterk aangeraden andere procedures te gebruiken. De volgende „speciale gevallen” kunnen worden genoemd (met voorbeelden van procedures die voor deze stoffen kunnen worden gebruikt): azokleurstoffen en diazoverbindingen (3)(5)(6)(13), gassen en vluchtige stoffen (12)(14)(15)(16) en glycosiden (17)(18). Voor een afwijking van de standaardprocedure moet een wetenschappelijke motivering worden gegeven.

#### 1.5. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

##### 1.5.1. Voorbereiding

###### 1.5.1.1. Bacteriën

Verse bacterieculturen worden gekweekt tot het laat-exponentiële of vroeg-stationaire groeistadium (ongeveer  $10^9$  cellen per ml). Culturen in de laat-stationaire fase mogen niet worden gebruikt. Het is van essentieel belang dat de bij het experiment gebruikte culturen een hoog gehalte aan levensvatbare bacteriën bevatten. De titer kan aan de hand van gegevens over groeicurves uit in het verleden uitgevoerde controles worden bepaald of door met behulp van een uitplaatexperiment het aantal levensvatbare cellen te bepalen.

De aanbevolen incubatietemperatuur is 37°C.

Er moeten ten minste vijf bacteriestammen worden gebruikt. Daarbij moeten vier stammen van *S. typhimurium* zijn (TA 1535; TA 1537, TA 97a of TA 97; TA 98; en TA 100) waarvan is aangetoond dat de resultaten betrouwbaar en in verschillende laboratoria reproduceerbaar zijn. Deze vier stammen van *S. typhimurium* hebben GC-basenparen op de primaire terugmutatieplaats en het is bekend dat bepaalde oxiderende mutagenen, cross-linkende stoffen en hydrazines daarmee niet altijd worden gesignaleerd. Voor deze stoffen kunnen de stammen WP2 van *E. coli* of TA 102 van *S. typhimurium* worden gebruikt (19), die een AT-basenpaar op de primaire terugmutatieplaats hebben. Als combinatie van stammen wordt derhalve aanbevolen:

- TA 1535 van *S. typhimurium* en
- TA 1537 of TA 97 of TA 97a van *S. typhimurium* en
- TA 98 van *S. typhimurium* en
- TA 100 van *S. typhimurium* en
- WP2 *uvrA* van *E. coli* of WP2 *uvrA* (pKM101) van *E. coli* of TA 12 van *S. typhimurium*.

Om cross-linkende mutagenen te signaleren kan het de voorkeur verdienen TA 102 of een stam van *E. coli* die bedreven is in DNA-herstel (bv. WP2 (pKM101) van *E. coli*) te gebruiken.

Er moeten erkende procedures voor de bereiding van voorraadculturen, markercontrole en opslag worden gebruikt. Voor elk preparaat van de ingevroren voorraadcultuur moet de aminozuurafhankelijkheid voor de groei worden aangetoond (histidine voor stammen van *S. typhimurium* en tryptofaan voor stammen van *E. Coli*). Ook ander fenotypekenmerken moeten worden gecontroleerd, namelijk: de aan- of afwezigheid van plasmiden met de R-factor, indien van toepassing (bv. resistentie tegen ampicilline bij de stammen TA 98, TA 100 en TA 97a of TA 97, WP2 *uvrA* en WP2 *uvrA* (pKM101) en resistentie tegen ampicilline en tetracycline bij stam TA 102); de aanwezigheid van karakteristieke mutaties (bv. de *rfa*-mutatie bij *S. typhimurium* door de gevoeligheid voor kristalviolet en de *uvrA*-mutatie bij *E. coli* of de *uvrB*-mutatie bij *S. typhimurium* door de gevoeligheid voor ultraviolet licht) (2)(3). Bij de stammen moeten ook spontane terugmutantkolonies voorkomen met een frequentie die ligt binnen het interval dat op grond van controlegegevens van het laboratorium uit het verleden kan worden verwacht en bij voorkeur binnen het interval dat in de literatuur wordt opgegeven.

#### 1.5.1.2. *Medium*

Er wordt gebruikgemaakt van een geschikte minimale agar (bv. met minimaal medium E van Vogel-Bonner en glucose) en een topagar met histidine en biotine of tryptofaan om een aantal celdelingen mogelijk te maken (1)(2)(9).

#### 1.5.1.3. *Metabole activering*

De bacteriën dienen zowel met als zonder een geschikt metabool activeringssysteem aan de teststof te worden blootgesteld. Het meest gebruikte systeem is een post-mitochondriale fractie aangevuld met een cofactor (S9), verkregen uit de lever van knaagdieren die zijn behandeld met enzym-inducerende stoffen als Aroclor 1254 (1)(2) of een combinatie van fenobarbiton en  $\beta$ -naftoilavon (18)(20)(21). De post-mitochondriale fractie wordt meestal gebruikt bij een concentratie van 5 tot 30% (v/v) in het S9-mengsel. De keuze en de omstandigheden voor het gebruik van een metabool activeringssysteem kunnen afhankelijk zijn van de aard van de geteste chemische verbinding. In sommige gevallen kan het nuttig zijn meer dan een concentratie van de post-mitochondriale fractie te gebruiken. Voor azokleurstoffen en diazoverbindingen kan wellicht beter een reductief metabool activeringssysteem worden gebruikt (6)(13).

#### 1.5.1.4. *Teststof/Bereiding*

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspenderd en eventueel vóór de behandeling van de bacteriën worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks aan het teststelsel worden toegediend en/of vóór behandeling worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen worden gebruikt.

Chemische reacties tussen het oplosmiddel/medium en de teststof moeten uitgesloten zijn en het oplosmiddel/medium moet verenigbaar zijn met het overleven van de bacteriën en de S9-activiteit (22). Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt. Wanneer stoffen worden getest die in water instabiel zijn, moeten de gebruikte organische oplosmiddelen watervrij zijn.

### 1.5.2. **Testomstandigheden**

#### 1.5.2.1. *Teststammen* (zie punt 1.5.1.1)

#### 1.5.2.2. *Blootstellingsconcentraties*

Bij de bepaling van de grootste te gebruiken hoeveelheid teststof moet onder andere rekening worden gehouden met de cytotoxiciteit en de oplosbaarheid in het uiteindelijke behandelingsmengsel.

Het kan nuttig zijn vooraf een apart experiment uit te voeren om de toxiciteit en de oplosbaarheid te bepalen. De cytotoxiciteit kan worden bepaald aan de hand van een daling in het aantal terugmutantkolonies, een opheldering of afname van de achtergrond of de mate waarin de behandelde culturen overleven. De cytotoxiciteit van een stof kan in aanwezigheid van een metabool activeringssysteem veranderen. De oplosbaarheid moet worden beoordeeld aan de hand van het met het blote oog zichtbare neerslaggedrag in het uiteindelijke mengsel onder de feitelijke testomstandigheden.

De aanbevolen maximale concentratie voor oplosbare niet-cytotoxische stoffen is 5 mg/plaat of 5 µl/plaat. Voor niet-cytotoxische stoffen die bij 5 mg/plaat of 5 µl/plaat niet oplosbaar zijn, moet een of meer van de geteste concentraties in het uiteindelijke behandelingsmengsel onoplosbaar zijn. Teststoffen die al bij lagere concentraties dan 5 mg/plaat of 5 µl/plaat cytotoxisch zijn, moeten tot een cytotoxische concentratie worden getest. Het neerslag mag niet storen bij het scoren.

Er moeten ten minste vijf analyseerbare concentraties van de teststof worden gebruikt met ongeveer een half log-interval (d.w.z. een factor  $\sqrt{10}$ ) tussen de concentraties voor een eerste experiment. Kleinere intervallen kunnen nuttig zijn wanneer het verband tussen concentratie en respons wordt onderzocht. Hogere concentraties dan 5 mg/plaat of 5 µl/plaat kunnen worden overwogen bij de beoordeling van stoffen die significante hoeveelheden potentieel mutagene verontreinigingen bevatten.

### 1.5.2.3. Negatieve en positieve controles

Bij elke bepaling moeten tegelijkertijd stam-specifieke positieve en negatieve (oplosmiddel of medium) controles worden uitgevoerd, zowel met als zonder metabole activering. De concentraties van de positieve controle moeten zodanig worden gekozen dat voor elke bepaling wordt aangetoond dat deze correcte resultaten oplevert.

Voor bepalingen waarbij een metabool activeringssysteem wordt gebruikt, moet(en) de voor de positieve controle gebruikte referentiestof(fen) op basis van de aard van de gebruikte bacteriestam worden gekozen.

Voor bepalingen met metabole activering kunnen als positieve controle bijvoorbeeld worden gebruikt:

Stof	Cas-nr.	Einecs-nr.
9,10-dimethylanthraceen	781-43-1	212-308-4
7,12-dimethylbenz[a]anthraceen	57-97-6	200-359-5
Benzo[a]pyreen	50-32-8	200-028-5
2-aminoantraceen	613-13-8	210-330-9
Cyclofosfamide	50-18-0	200-015-4
Cyclofosfamide monohydraat	6055-19-2	

Voor de methode met reductieve metabole activering kan als positieve controle worden gebruikt:

Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.
Kongo rood	573-58-0	209-358-4

2-aminoantraceen mag niet als enige indicator voor de werkzaamheid van het S9-mengsel worden gebruikt. Als 2-aminoantraceen wordt gebruikt, moet elke charge S9 ook worden gekarakteriseerd met een mutageen waarvoor metabole activering met microsomale enzymen nodig is, zoals benzo[a]pyreen of dimethylbenzantreeen.

Voor bepalingen zonder exogeen metabool activeringsstelsel kunnen als stam-specifieke positieve controle bijvoorbeeld worden gebruikt:

Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.	Stam
Natriumazide	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 en TA 100
2-nitrofluoreen	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-aminoacridine	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 en TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 en TA 97a
Cumeenhydroperoxide	80-15-9	201-254-7	TA 102
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6	WP2 uvrA en TA 102
N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2 uvrA en WP2 uvrA(pKM101)
4-nitroquinoline-1-oxide	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2 uvrA en WP2 uvrA(pKM101)
Furylfuramide (AF2)	3688-53-7		Stammen die plasmiden bevatten

Ook andere geschikte stoffen kunnen als positieve controle worden gebruikt. Waar mogelijk dient het gebruik van stoffen uit een verwante chemische klasse als positieve controle te worden overwogen.

In het experiment dienen negatieve controles te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel of het medium zonder teststof wordt toegediend en die verder op dezelfde manier als de andere groepen worden behandeld. Daarnaast moeten er ook controles worden gebruikt waaraan niets wordt toegediend, tenzij in het verleden reeds is aangetoond dat het gekozen oplosmiddel geen schadelijke of mutagene effecten veroorzaakt.

### 1.5.3. Uitvoering

Voor de methode met geïntegreerde voedingsbodem (1)(2)(3)(4) zonder metabole activering wordt meestal 0,05 ml of 0,1 ml testoplossing, 0,1 ml verse bacteriecultuur (met ongeveer  $10^8$  levensvatbare cellen) en 0,5 ml steriele buffer gemengd met 2,0 ml topagar. Voor de bepaling met metabole activering wordt meestal 0,5 ml van het metabool activeringsmengsel met een afdoende hoeveelheid post-mitochondriale fractie (tussen 5 en 30% (v/v) in het metabole activeringsmengsel) gemengd met de topagar (2,0 ml), de bacteriën en de teststof/testoplossing. De inhoud van elke buis wordt gemengd en uitgetogen over het oppervlak van een minimale agarplaat. De topagar krijgt voor de incubatie de gelegenheid te stollen.

Voor de preïncubatiemethode (2)(3)(5)(6) wordt de teststof/testoplossing gepreïncubeerd met de teststam (met ongeveer  $10^8$  levensvatbare cellen) en steriele buffer of het metabole activeringsstelsel (0,5 ml), meestal gedurende minimaal 20 minuten bij 30-37°C, en vervolgens gemengd met de topagar en uitgetogen over het oppervlak van een minimale agarplaat. Meestal wordt 0,05 ml of 0,1 ml teststof/testoplossing, 0,1 ml bacteriën en 0,5 ml S9-mengsel of steriele buffer gemengd met 2,0 ml topagar. De buizen dienen gedurende de preïncubatie met behulp van een schudmachine te worden belucht.

Om een adequate raming van de spreiding te kunnen maken moeten voor elk dosisniveau drie platen worden gebruikt. Het gebruik van twee platen is aanvaardbaar wanneer daarvoor een wetenschappelijke motivering wordt gegeven. Wanneer nu en dan een plaat verloren gaat, maakt dit de bepaling niet noodzakelijkerwijs onbruikbaar.

Bij het testen van gassen of vluchtige stoffen moet een daarvoor geschikte methode worden gevolgd, bijvoorbeeld in een gesloten kweekvat (12)(14)(15)(16).

#### 1.5.4. **Incubatie**

Alle platen voor een bepaling worden gedurende 48-72 uur bij 37°C geïncubeerd. Na de incubatieperiode wordt het aantal terugmutantkolonies per plaat geteld.

### 2. **GEGEVENS**

#### 2.1. **BEHANDELING VAN DE RESULTATEN**

De gegevens worden vermeld als het aantal terugmutantkolonies per plaat. Daarnaast moet ook het aantal terugmutantkolonies op de platen voor zowel negatieve (oplosmiddel en zonder behandeling, indien gebruikt) als positieve controle worden vermeld. Voor zowel de teststof als de positieve en negatieve (zonder behandeling en/of oplosmiddel) controle moeten de tellingen per plaat, het gemiddelde aantal terugmutantkolonies per plaat en de standaardafwijking worden vermeld.

Een duidelijk positieve reactie hoeft niet te worden bevestigd. Bij onduidelijke resultaten moet nader onderzoek worden gedaan, bij voorkeur onder gewijzigde experimentele omstandigheden. Negatieve resultaten moeten per geval worden bevestigd. Wanneer een bevestiging van negatieve resultaten niet nodig wordt geacht, moet daarvoor een motivering worden gegeven. Bij vervolggexperimenten dient wijziging van parameters te worden overwogen om de bepaling uit te breiden tot een breder scala van omstandigheden. Parameters die voor wijziging in aanmerking komen zijn bijvoorbeeld de concentratie-intervallen, de wijze van behandeling (geïntegreerde voedingsbodem of preïncubatie in vloeistof) en de omstandigheden bij metabole activering.

#### 2.2. **EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN**

Er zijn verschillende criteria om tot een positief resultaat te besluiten, zoals een concentratieafhankelijke stijging op het geteste interval en/of een reproduceerbare stijging bij een of meer concentraties van het aantal terugmutantkolonies per plaat bij ten minste één stam met of zonder metabool activeringssysteem (23). In eerste instantie moet naar de biologische relevantie van de resultaten worden gekeken. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt (24). Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn.

Indien de resultaten voor een teststof niet aan bovenstaande criteria voldoen, wordt de stof bij deze test als niet-mutageen beschouwd.

Hoewel de meeste experimenten duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt herhaald, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de terugmutatietest met bacteriën wijzen erop dat de teststof puntmutaties door basenpaarvervangning of leesraamverschuiving in het genoom van *Salmonella typhimurium* en/of *Escherichia coli* induceert. Negatieve resultaten wijzen erop dat de stof onder de testomstandigheden bij de geteste soort niet mutageen is.

### 3. **RAPPORTAGE**

#### TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Oplosmiddel/Medium:

- motivering voor de keuze van het oplosmiddel/medium:
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend.

Stammen:

- gebruikte stammen:
- aantal cellen per cultuur:
- kenmerken van de stam.

#### Testomstandigheden:

- hoeveelheid teststof per plaat (in mg/plaat of µl/plaat) met vermelding van de achtergrond voor de keuze van de dosis en het aantal platen per concentratie;
- gebruikte media;
- aard en samenstelling van het metabool activeringssysteem, met inbegrip van aanvaardbaarheidscriteria;
- procedures voor de behandeling.

#### Resultaten:

- tekenen van toxiciteit;
- neerslagverschijnselen;
- tellingen per plaat;
- gemiddeld aantal terugmutantkolonies per plaat met de standaardafwijking;
- indien mogelijk het verband tussen dosis en respons;
- eventuele statistische analyses;
- gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking;
- gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

#### 4. REFERENTIES

- (1) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.
- (2) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.
- (3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994). Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. *Mutation Res.*, 312, pp. 217-233.
- (4) Kier, L.D., Brusick D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T.K. and Ray V. (1986). The Salmonella typhimurium/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.*, 168, pp. 69-240.
- (5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975). Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters*, 1, pp. 91-96.
- (6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980). Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests. In: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*. Ed. Norporth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273-285.
- (7) Gatehouse, D.G., Rowland, L.R., Wilcox, P., Callender, R.D. and Foster, R. (1980). Bacterial Mutation Assays. In: *Basic Mutagenicity Tests: UREMS Part 1 Revised*. Ed. D.J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.
- (8) Aeschacher, H.U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987). Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. *J. Food Safety*, 8, pp. 167-177.

- (9) Green, M.H.L., Muriel, W.J. and Bridges, B.A. (1976). Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. *Mutation Res.*, 38, pp. 33-42.
- (10) Hubbard, S.A., Green, M.H.L., Gatehouse, D. and Bridges, J.W. (1984). The Fluctuation Test in Bacteria. In: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. 2nd Edition. Ed. Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.
- (11) Thompson, E.D. and Melampy, P.J. (1981). An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*. *Environmental Mutagenesis*, 3, pp. 453-465.
- (12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994). Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag. *Mutation Res.*, 307, pp. 335-344.
- (13) Prival, M.J., Bell, S.J., Mitchell, V.D., Reipert, M.D. and Vaughan, V.L. (1984). Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified *Salmonella* Assay. *Mutation Res.*, 136, pp. 33-47.
- (14) Zeiger, E., Anderson, B.E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992). *Salmonella* Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, pp. 2-141.
- (15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R.G. (1977). Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water. In *Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (Eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.
- (16) Hughes, T.J., Simmons, D.M., Monteith, I.G. and Claxton, L.D. (1987). Vaporization Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/*Salmonella* Assay. *Environmental Mutagenesis*, 9, pp. 421-441.
- (17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura, T. (1979). Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*. *Cancer Res.*, 39, pp. 3780-3782.
- (18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B.N. (1980). Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, pp. 4961-4965.
- (19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D.J. and Gatehouse, D.G. (1990). Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains. *Mutagenesis*, 5, pp. 285-291.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing* Eds. F.J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.
- (21) Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in in vitro Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.
- (22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B.N. (1981). Compatibility of Organic Solvents with the *Salmonella*/Microsome Test. *Mutation Res.*, 88, pp. 343-350.
- (23) Claxton, L.D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987). Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity. *Mutation Res.* 189, pp. 83-91.
- (24) Mahon, G.A.T., Green, M.H.L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W.D. and Tweats, D.J. (1989). Analysis of Data from Microbial Colony Assays. In: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*. Ed. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

-----



1. **METHODE**

1.1. **Inleiding**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. **Definitie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. **Referentiestoffen**

Geen.

1.4. **Principe van de onderzoekmethode**

Er kunnen verschillende haploïde en diploïde stammen van de gist *Saccharomyces cerevisiae* worden gebruikt om de door chemische stoffen geïnduceerde genmutaties te meten, dit zowel met als zonder metabole activering.

Voorwaartse mutatiesystemen bij haploïde stammen zoals de meting van mutatie van rode mutanten met adeninebehoefte (*ade-1*, *ade-2*) naar witte mutanten met dubbele adeninebehoefte en selectieve systemen zoals de inductie van canavanine- en cycloheximideresistentie zijn gebruikt.

Het meest uitgebreid gevalideerde terugwaartse mutatiesysteem maakt gebruik van de haploïde stam XV 185-14C welke de oker nonsens mutaties *ade 2-1*, *arg 4-17*, *lys 1-1* en *trp 5-48* draagt die omkeerbaar zijn door basesubstitutiemutagenen die plaatsspecifieke mutaties of oker suppressor mutaties induceren. XV 185-14C heeft ook het *his 1-7* kenmerk, een „missense” mutatie die hoofdzakelijk wordt gereverteerd door tweede-plaatsmutaties, en het *hom 3-10* kenmerk, dat wordt gereverteerd door „frame shift”-mutagenen (verschuivingen in het lees kader).

Van de diploïde stammen van *S.cerevisiae* wordt alleen D7, die homozygoot is voor *ilv 1-92*, uitgebreid gebruikt.

1.5. **Kwaliteitscriteria**

Geen.

1.6. **Beschrijving van de onderzoekmethode**

*Vorbereidingen*

De oplossingen van de teststof en van controle- of referentiestoffen dienen kort voor het uitvoeren van de test te worden bereid met behulp van een geschikt medium. Voor niet in water oplosbare organische stoffen moet een oplossing van niet meer dan 2% v/v organische oplosmiddelen, zoals ethanol, aceton of dimethylsulfoxyde (DMSO) worden gebruikt. De eindconcentratie van het oplosmiddel dient de levensvatbaarheid en de groeikarakteristieken van de cel niet significant te beïnvloeden.

*Metabole activering*

De cellen moeten met en zonder een geschikt exogeen metabool activeringssysteem aan de teststoffen worden blootgesteld.

Het meest gebruikte systeem is een met een cofactor aangevulde postmitochondriale fractie bereid uit levers van knaagdieren die met enzyminducerende agentia zijn voorbehandeld. Het gebruik van andere diersoorten, weefsels, postmitochondriale fracties of procedures kan ook geschikt zijn voor het verkrijgen van metabole activering.

### *Proefomstandigheden*

#### Proefstammen

De haploïde stam XV 185-14 C en de diploïde stam D<sub>7</sub> zijn het meest gebruikt voor onderzoek naar genmutaties. Andere stammen kunnen eveneens geschikt zijn.

#### Media

Er worden geschikte media gebruikt voor de bepaling van overleving en het aantal mutaties.

#### Gebruik van negatieve en positieve controles

Positieve, onbehandelde en oplosmiddelencontroles moeten parallel worden uitgevoerd. Voor elk specifiek mutatie-eindpunt moeten geschikte positieve controlechemicaliën worden gebruikt.

#### Blootstellingsconcentraties

Er zijn ten minste vijf behoorlijk gespreide concentraties van de teststof vereist. Voor toxische stoffen mag de hoogste geteste concentratie het overlevingspercentage niet tot minder dan 5 à 10% verlagen. In water relatief onoplosbare stoffen dienen met behulp van geschikte methoden tot de uiterste oplosbaarheidsgrens te worden onderzocht. Voor volledig in water oplosbare niet-toxische stoffen dient de hoogste concentratie per geval te worden bepaald.

#### Incubatieomstandigheden

De platen worden gedurende vier tot zeven dagen bij 28 tot 30 °C in het donker geïncubeerd.

#### Spontane mutatiefrequenties

Er dienen subculturen te worden gebruikt met een spontane mutatiefrequentie binnen de normaal aanvaarde grenzen.

#### Aantal replica's

Voor de analyse van door genmutatie geproduceerde prototrofen en de levensvatbaarheid van de cellen moeten per concentratie ten minste drie replicaplaten worden gebruikt. Voor proefnemingen met kenmerken zoals hom 3—10 met een laag mutatie-niveau moet het aantal gebruikte platen worden verhoogd, ten einde statistisch relevante gegevens te verkrijgen.

#### *Uitvoering*

*S. cerevisiae*-stammen worden gewoonlijk behandeld in een vloeistof-test met hetzij stationaire hetzij groeiende cellen. Het eerste experiment moet worden uitgevoerd met groeiende cellen.  $1 - 5 \times 10^7$  cellen per ml worden gedurende maximaal achttien uur bij 28 tot 37 °C onder schudden aan de teststof blootgesteld; een passende hoeveelheid van een metabool activeringssysteem wordt tijdens de behandeling toegevoegd, waar dat van toepassing is. Na de behandeling worden de cellen gecentrifugeerd, uitgewassen en uitgezaaid op een geschikt cultuurmedium. Na incubatie worden op de platen overleving en de inductie van genmutaties bepaald.

Indien het eerste experiment negatief is, moet een tweede experiment worden uitgevoerd met stationaire cellen. Als het eerste experiment positief is, dient dit in een passend, onafhankelijk experiment te worden bevestigd.

2.

#### GEGEVENS

De gegevens moeten in tabellen worden samengevat met vermelding van het aantal getelde kolonies, het aantal mutanten, overlevings- en mutatiefrequenties. Alle resultaten moeten in een onafhankelijke proef worden bevestigd. De gegevens moeten met behulp van een geschikte statistische methode worden geëvalueerd.

### 3. VERSLAGGEVING

#### 3.1. Verslag van de proefneming

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- gebruikte stam;
- proefomstandigheden: stationaire fase of groeiende cellen; samenstelling van de media; incubatietemperatuur en -duur; metabool activeringstelsel;
- behandelingsomstandigheden: blootstellingsniveaus; procedure en duur van de behandeling; behandelings temperatuur; positieve en negatieve controles;
- aantal getelde kolonies; aantal mutanten; overlevings- en mutatiefrequentie; dosis-responsverhouding (waar dat van toepassing is); statistische beoordeling van gegevens;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

#### 3.2. Evaluatie en interpretatie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

### 4. LITERATUUR

Zie Algemene inleiding — Deel B.

---

1. **METHODE**1.1. **Inleiding**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. **Definitie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. **Referentiestoffen**

Geen.

1.4. **Principe van de onderzoekmethode**

Mitotische recombinatie bij *Saccharomyces cerevisiae* kan worden vastgesteld tussen genen (of meer algemeen tussen een gen en zijn centromeer) en binnen genen. Het eerste verschijnsel wordt mitotische overkruising genoemd en genereert reciproke produkten terwijl het laatste verschijnsel meestal niet reciprook is en genconversie wordt genoemd. Overkruising kan over het algemeen worden vastgesteld door de produktie van recessieve homozygote kolonies of sectoren in een heterozygote stam terwijl genconversie wordt vastgesteld door de produktie van prototrofe revertanten in een auxotrofe heteroallele stam die twee verschillende defecte allelen van hetzelfde gen draagt. De voor het opsporen van mitotische genconversie meest gebruikte stammen zijn *D*<sub>4</sub> (heteroallele in *ade2* en *trp5*), *D*<sub>7</sub> (heteroallele in *trp5*), *BZ*<sub>3,4</sub> (heteroallele in *arg4*) en *JD1* (heteroallele in *his4* en *trp5*). Mitotische overkruising waarbij rode en roze homozygote sectoren worden geproduceerd, kan worden vastgesteld in *D*<sub>5</sub> of *D*<sub>7</sub> (waarin ook de mitotische genconversie en de terugwaartse mutatie in *ilv* 1-92 worden gemeten), aangezien beide stammen heteroallele zijn voor complementerende allelen van *ade2*.

1.5. **Kwaliteitscriteria**

Geen

1.6. **Beschrijving van de onderzoekmethode***Vorbereidingen*

Oplossingen van de teststof en van controle- of referentiestoffen dienen kort voor het uitvoeren van de test te worden bereid met behulp van een geschikt medium. Voor niet in water oplosbare organische stoffen moet een oplossing van niet meer dan 2% v/v organische oplosmiddelen, zoals ethanol, aceton en dimethylsulfoxyde (DMSO) worden gebruikt. De eindconcentratie van het oplosmiddel dient de levensvatbaarheid en de groeikarakteristieken van de cel niet significant te beïnvloeden.

**Metabole activering**

De cellen moeten zowel met als zonder een geschikt exogeen metabool activeringssysteem aan de teststoffen worden blootgesteld. Het meest gebruikte systeem is een met cofactor aangevulde postmitochondriale fractie bereid uit de levers van knaagdieren die voorbehandeld zijn met enzyminducerende agentia.

Het gebruik van andere diersoorten, weefsels, postmitochondriale fracties of procedures kan eveneens geschikt zijn voor het verkrijgen van metabole activering.

*Proefomstandigheden***Proefstammen**

De meest gebruikte stammen zijn de diploïden *D*<sub>4</sub>, *D*<sub>5</sub>, *D*<sub>7</sub> en *JD1*. Andere stammen kunnen ook gebruikt worden.

## Media

Er worden geschikte cultuurmedia gebruikt voor de bepaling van overleving en de mitotische recombinatiefrequentie.

## Gebruik van negatieve en positieve controles

Positieve, onbehandelde en oplosmiddelcontroles moeten parallel worden uitgevoerd. Voor elk specifiek recombinatie-eindpunt moeten geschikte positieve controlestoffen worden gebruikt.

## Blootstellingsconcentraties

Er zijn ten minste vijf behoorlijk gespreide concentraties van de teststof vereist. Factoren waarmee rekening moet worden gehouden zijn cytotoxiciteit en oplosbaarheid. De laagste concentratie mag geen effect hebben op de levensvatbaarheid van de cellen. Voor toxische chemicaliën mag de hoogste geteste concentratie het overlevingspercentage niet tot minder dan 5 à 10% verlagen. In water relatief onoplosbare chemicaliën dienen met behulp van geschikte methoden tot de uiterste oplosbaarheidsgrens te worden onderzocht. Voor volledig in water oplosbare niet-toxische stoffen dient de hoogste concentratie per geval te worden bepaald.

De cellen kunnen, hetzij in de stationaire fase hetzij tijdens de groei, gedurende perioden van maximaal achttien uur aan de teststof worden blootgesteld. Bij lange behandelingstijden dienen de culturen evenwel microscopisch te worden gecontroleerd op spoorvorming, aangezien de proef daardoor zijn waarde verliest.

## Incubatieomstandigheden

De platen worden in het donker gedurende vier tot zeven dagen bij 28 tot 30 °C geïncubeerd. Platen die worden gebruikt voor het opsporen van door mitotische overkruising geproduceerde rode en roze homozygote sectoren dienen voor het tellen nog een à twee dagen in een koelkast te worden bewaard ( $\pm 4$  °C), ten einde de ontwikkeling van de geschikt gepigmenteerde kolonies te laten plaatsvinden.

## Spontane mitotische recombinatiefrequentie

Er moeten subculturen worden gebruikt met een spontane mitotische recombinatiefrequentie binnen de normaal aanvaarde grenzen.

## Aantal replica's

Per concentratie moeten ten minste drie replicaplaten worden gebruikt voor de bepaling van het aantal door mitotische genconversie geproduceerde prototrofen en de levensvatbaarheid van de cellen. Indien het aantal door mitotische overkruising geproduceerde recessieve homozygoten wordt bepaald ( $\pm 4$  °C), dient het aantal platen te worden verhoogd, opdat een voldoende aantal kolonies kan worden onderzocht.

## Uitvoering

*S. cerevisiae*-stammen worden gewoonlijk in een vlocistoftest behandeld en er worden hetzij stationaire hetzij groeiende cellen gebruikt. Het eerste experiment moet worden uitgevoerd met groeiende cellen.  $1 - 5 \times 10^7$  cellen per ml worden gedurende maximaal achttien uur bij 28 tot 37 °C onder schudden aan de teststof blootgesteld; tijdens de behandeling wordt een passende hoeveelheid van een metabool activeringssysteem toegevoegd, waar dat van toepassing is.

Na de behandeling worden de cellen gecentrifugeerd, uitgewassen en uitgeplaat op een geschikt cultuurmedium. Na incubatie wordt op de platen de overleving en de inductie van mitotische recombinaties bepaald.

Indien het eerste experiment negatief is, moet een tweede experiment worden uitgevoerd met stationaire cellen. Als het eerste experiment positief is, dient dit in een passend, onafhankelijk experiment te worden bevestigd.

## 2. GEGEVENS

De gegevens moeten in tabellen worden samengevat met vermelding van het aantal getelde kolonies, het aantal recombinanten, overleving en recombinatiefrequentie.

Alle resultaten worden in een onafhankelijke proef bevestigd.

De gegevens moeten met behulp van een geschikte statistische methode worden geëvalueerd.

3. **VERSLAGGEVING**

3.1. **Verslag van de proefneming**

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- gebruikte stam;
- proefomstandigheden: stationaire fase of groeiende cellen; samenstelling van de media; incubatietemperatuur en -duur; metabool activeringssysteem;
- behandelingsomstandigheden: blootstellingsconcentratie; procedure en duur van de behandeling; behandelingstemperatuur; positieve en negatieve controles;
- aantal getelde kolonies; aantal recombinanten; overleving en recombinatie-frequentie; dosis — responsverhouding (waar dat van toepassing is); statistische evaluatie van de gegevens;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. **LITERATUUR**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

---

## „B.17. MUTAGENITEIT — IN-VITROGENMUTATIETEST MET ZOOGDIERCELLEN

### 1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 476 van de OESO: In-vitrogenmutatietest met zoogdiercellen (1997).

#### 1.1. INLEIDING

De in-vitrogenmutatietest met zoogdiercellen kan worden gebruikt voor de detectie van genmutaties die door chemische stoffen zijn geïnduceerd. Geschikte cellijnen zijn bijvoorbeeld de L5178Y-muizenlymfocoomcellen, de cellijnen CHO, CHO-AS52 en V79 van Chinese hamsters en de humane TK6-lymfoblastoidcellen (1). Bij deze cellijnen zijn de meest gangbare genetische eindpunten: een mutatie bij thymidinekinase (TK), hypoxanthine-guanine-fosforibosyltransferase (HPRT) en transgeen xanthine-guanine-fosforibosyltransferase (XPRT). Bij de mutatietests met TK, HPRT en XPRT worden verschillende spectra van genetische gebeurtenissen gedetecteerd. Door de ligging van TK en XPRT op autosomen kunnen genetische gebeurtenissen worden gedetecteerd (bv. grote deleties) die niet op de HPRT-locus op X-chromosomen worden gesignaleerd (2)(3)(4)(5)(6).

bij de in-vitrogenmutatietest met zoogdiercellen kunnen culturen van permanente cellijnen of celstammen worden gebruikt. De gebruikte cellen worden geselecteerd op basis van het groeivermogen in een cultuur en de stabiliteit van de spontane mutatiefrequentie.

Bij in vitro uitgevoerde tests moet er meestal een exogene metabole activeringsbron worden gebruikt. Dit metabole activeringssysteem kan de omstandigheden in een zoogdiercel in vivo niet volledig nabootsen. Er moet goed op worden gelet dat omstandigheden die kunnen leiden tot positieve resultaten die niet het gevolg zijn van intrinsieke mutageniteit, worden vermeden. Positieve resultaten die niet het gevolg zijn van intrinsieke mutageniteit, kunnen ontstaan door veranderingen in de pH of de osmolaliteit of een sterke cytotoxiciteit (7).

Deze test wordt gebruikt voor de screening op mogelijke mutagenen en carcinogenen voor zoogdieren. Veel stoffen die positief op deze test reageren, zijn carcinogeen voor zoogdieren, maar er is geen absolute correlatie tussen deze test en carcinogeniteit. De correlatie is afhankelijk van de chemische klasse en het lijkt er steeds meer op dat er carcinogenen zijn die niet met deze test worden gesignaleerd omdat ze blijkbaar via andere niet-genotoxische of in bacteriecellen afwezige mechanismen werken (6).

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

#### 1.2. DEFINITIES

**Voorwaartse mutatie:** een genmutatie van het oudertype naar de mutantvorm die leidt tot wijziging of verlies van de enzymactiviteit of de functie van het gecodeerde eiwit.

**Mutageen met basenpaarvervanging:** een stof die vervanging van een of meer basenparen in het DNA veroorzaakt.

**Mutageen met leesraamverschuiving:** een stof die invoeging of deletie van een of meer basenparen in het DNA-molecuul veroorzaakt.

**Fenotypische expressietijd:** de periode gedurende welke ongewijzigde genproducten uit pas gemuteerde cellen verdwijnen.

**Mutantfrequentie:** de verhouding tussen het aantal waargenomen mutantcellen en het aantal levensvatbare cellen.

**Relatieve totale groei:** de toename van het aantal cellen in de loop van de tijd in vergelijking met een controle-cel populatie, berekend als het product van de suspensiegroei in vergelijking met de negatieve controle en de kloneringsefficiëntie in vergelijking met de negatieve controle.

**Relatieve suspensiegroei:** de toename van het aantal cellen tijdens de expressieperiode in vergelijking met de negatieve controle.

**Levensvatbaarheid:** de kloneringsefficiëntie van de behandelde cellen bij het uitplaten in selectieve omstandigheden na de expressieperiode.

**Overleving:** de kloneringsefficiëntie van de behandelde cellen bij het uitplaten aan het eind van de behandelingsperiode; de overleving wordt meestal uitgedrukt in vergelijking met de controle-celpopulatie.

### 1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Cellen met een deficiëntie aan thymidinekinase (TK) door de mutatie  $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$  zijn resistent voor de cytotoxische effecten van de pyrimidine-analoog trifluorhymidine (TFT). Cellen zonder deficiëntie aan thymidinekinase zijn gevoelig voor TFT, waardoor het celmetabolisme wordt geremd en er geen celdeling meer plaatsvindt. Dit betekent dat mutantcellen zich in aanwezigheid van TFT kunnen voortplanten en normale cellen, die thymidinekinase bevatten, niet. Analooq hieraan worden ook cellen met een deficiëntie aan HPRT of XPRT geselecteerd door resistentie voor 6-thioguanine (TG) of 8-azaguanine (AG). De eigenschappen van de teststof moeten zorgvuldig worden bekeken als een base-analoog of een met de selecterende stof verwante verbinding aan een van de genmutatietests met zoogdiercellen wordt onderworpen. Eventuele vermoedens omtrent selectieve toxiciteit van de teststof bij mutantcellen en gewone cellen moeten nader worden onderzocht. Bij het testen van chemische stoffen die verwant zijn met de selecterende stof moet worden bevestigd of het selectiesysteem en de selecterende stof bruikbaar zijn (8).

Cellen in een suspensie of een monolaagcultuur worden zowel met als zonder metabole activering gedurende een geschikte periode aan de teststof blootgesteld en overgeënt om de cytotoxiciteit te bepalen en fenotypische expressie mogelijk te maken alvorens de mutanten te selecteren (9)(10)(11)(12)(13). De cytotoxiciteit wordt meestal bepaald door de relatieve kloneringsefficiëntie (overleving) of de relatieve totale groei van de culturen na de behandelingsperiode te meten. De behandelde culturen blijven een voldoende lange periode, kenmerkend voor elke locus en elk celtype, in groeimedium om een vrijwel optimale fenotypische expressie van de geïnduceerde mutaties mogelijk te maken. De mutantfrequentie wordt bepaald door bekende aantallen cellen te enten in medium met de selecterende stof voor de detectie van mutantcellen en in medium zonder de selecterende stof voor de bepaling van de kloneringsefficiëntie (levensvatbaarheid). Na een geschikte incubatietijd worden de kolonies geteld. De mutantfrequentie wordt bepaald aan de hand van het aantal mutantkolonies in het selectieve medium en het aantal kolonies in het niet-selectieve medium.

### 1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

#### 1.4.1. Voorbereiding

##### 1.4.1.1. Cellen

Er kunnen verschillende soorten cellen voor deze test worden gebruikt, zoals subklonen van de cellijnen L5178Y, CHO, CHO-AS52, V79 of TK6. Van de bij deze test gebruikte cellen moet worden aangetoond dat ze gevoelig zijn voor chemische mutagenen en een hoge kloneringsefficiëntie en een stabiele spontane mutantfrequentie hebben. De cellen moeten op besmetting met mycoplasma worden gecontroleerd en mogen bij besmetting niet worden gebruikt.

De test moet zodanig worden opgezet dat deze een vooraf bepaalde gevoeligheid en onderscheidingsvermogen heeft. Het aantal cellen, culturen en concentraties van de teststof moet aan de hand van deze vooraf bepaalde parameters worden gekozen (14). Het minimale aantal levensvatbare cellen dat de behandeling overleeft en bij elke fase van de test wordt gebruikt, moet op basis van de spontane mutatiefrequentie worden gekozen. Een vuistregel is dat het gebruikte aantal cellen ten minste tien keer zo groot moet zijn als de inverse van de spontane mutatiefrequentie. Aanbevolen wordt echter ten minste  $10^6$  cellen te gebruiken. Er moeten afdoende gegevens uit het verleden over het gebruikte celsysteem beschikbaar zijn om aan te kunnen nemen dat de test consistente resultaten oplevert.

##### 1.4.1.2. Media en kweekomstandigheden

Er moet worden gezorgd voor geschikte kweekmedia en incubatieomstandigheden (kweekvat, temperatuur,  $CO_2$ -concentratie, en vochtigheid). De media moeten worden gekozen op basis van de bij de test gebruikte selectieve systemen en celtypen. Het is vooral belangrijk dat de kweekomstandigheden zodanig worden gekozen dat de celgroei tijdens de expressieperiode en het kolonievormend vermogen van zowel de mutantcellen als de gewone cellen optimaal zijn.



#### 1.4.1.3. *Bereiding van de culturen*

Cellen uit stamculturen worden in een kweekmedium geënt en bij 37 °C geïncubeerd. Het is wellicht nodig reeds aanwezige mutantcellen uit de cultuur te verwijderen voordat deze voor de test wordt gebruikt.

#### 1.4.1.4. *Metabole activering*

De cellen dienen zowel met als zonder een geschikt metabool activeringssysteem aan de teststof te worden blootgesteld. Het meest gebruikte systeem is een post-mitochondriale fractie aangevuld met een cofactor (S9), verkregen uit de lever van knaagdieren die zijn behandeld met enzym-inducerende stoffen als Aroclor 1254 (15)(16)(17)(18) of een combinatie van fenobarbiton en  $\beta$ -naftoflavon (19)(20).

De post-mitochondriale fractie wordt meestal gebruikt bij een concentratie van 1-10% (v/v) in het uiteindelijke medium. De keuze en omstandigheden voor het gebruik van een metabool activeringssysteem kunnen afhankelijk zijn van de aard van de geteste chemische verbinding. In sommige gevallen zal wellicht meer dan een concentratie van de post-mitochondriale fractie moeten worden gebruikt.

Een aantal ontwikkelingen, bijvoorbeeld de opbouw van genetisch aangepaste cellijnen waarin specifieke activeringsenzymen tot expressie komen, kan endogene activering mogelijk maken. Voor de keuze van de gebruikte cellijnen moet een wetenschappelijke verantwoording worden gegeven (bv. aan de hand van de relevantie van het cytochrom P450-isoenzym voor het metabolisme van de teststof).

#### 1.4.1.5. *Teststof/Bereiding*

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspenderd en eventueel vóór de behandeling van de cellen worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks aan het testsysteem worden toegediend en/of vóór de behandeling worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen van de teststof worden gebruikt.

### 1.4.2. **Testomstandigheden**

#### 1.4.2.1. *Oplosmiddel/Medium*

Chemische reacties tussen het oplosmiddel/medium en de teststof moeten uitgesloten zijn en het oplosmiddel/medium moet verenigbaar zijn met het overleven van de cellen en de S9-activiteit. Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt. Wanneer stoffen worden getest die in water instabiel zijn, moeten de gebruikte organische oplosmiddelen watervrij zijn. Water kan door toevoeging van een moleculaire zeef worden verwijderd.

#### 1.4.2.2. *Blootstellingsconcentraties*

Bij de bepaling van de hoogste concentratie moet onder andere rekening worden gehouden met de cytotoxiciteit, de oplosbaarheid in het testsysteem en veranderingen in de pH of de osmolaliteit.

De cytotoxiciteit moet met en zonder metabole activering in het hoofdexperiment worden bepaald aan de hand van adequate indicaties omtrent de integriteit en de groei van de cellen, zoals de relatieve kloneringsefficiëntie (overleving) of de relatieve totale groei. Het kan nuttig zijn vooraf een apart experiment uit te voeren om de cytotoxiciteit en de oplosbaarheid te bepalen.

Er moeten ten minste vier analyseerbare concentraties worden gebruikt. Wanneer er cytotoxiciteit optreedt, moeten deze concentraties een interval van de maximale tot geen of vrijwel geen toxiciteit bestrijken; dit betekent meestal dat de concentratieniveaus niet meer dan een factor 2 tot  $\sqrt{10}$  uit elkaar mogen liggen. Als de maximale concentratie op cytotoxische effecten is gebaseerd, moet de relatieve overleving (relatieve kloneringsefficiëntie) of de relatieve totale groei daarbij op ongeveer 10-20% liggen (maar niet lager dan 10%). Bij stoffen met een betrekkelijk geringe cytotoxiciteit moet de maximale concentratie 5 mg/ml, 5  $\mu$ l/ml of 0.01 M (de laagste van deze drie) zijn.

Bij betrekkelijk onoplosbare stoffen moet de hoogste dosis bij of boven de oplosbaarheidsgrens onder de kweekomstandigheden liggen. De oplosbaarheidsgegevens moeten worden bepaald in het uiteindelijke behandelingsmedium waaraan de cellen worden blootgesteld. Het kan nuttig zijn de oplosbaarheid aan het begin en het eind van de behandeling te bepalen, aangezien de oplosbaarheid tijdens de blootstelling in het testsysteem door de aanwezigheid van bijvoorbeeld cellen, S9 of serum kan veranderen. Onoplosbaarheid kan met het blote oog worden geconstateerd. Het neerslag mag niet storen bij het scoren.

### 1.4.2.3. Controles

Bij elk experiment moeten tegelijkertijd positieve en negatieve (oplosmiddel of medium) controles worden uitgevoerd, zowel met als zonder metabole activering. Wanneer metabole activering wordt gebruikt, moet de voor de positieve controle gebruikte chemische stof activering vereisen om een mutagene reactie te veroorzaken.

Als positieve controle kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt:

Metabole activering	Locus	Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.
Zonder exogene metabole activering	HPRT	Ethylmethaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
		Ethylnitrosouream	759-73-9	212-072-2
	TK (kleine en grote kolonies)	Methylmethaansulfonaat	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Ethylmethaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
		Ethylnitrosouream	759-73-9	212-072-2
Met exogene metabole activering	HPRT	3-Methylcholanthreen	56-49-5	200-276-4
		N-Nitrosodimethylamine	62-75-9	200-549-8
		7,12-Dimethylbenzanthraceen	57-97-6	200-359-5
	TK (kleine en grote kolonies)	Cyclofosfamide	50-18-0	200-015-4
		Cyclofosfamide monohydraat	6055-19-2	
		Benzo[a]pyreen	50-32-8	200-028-5
		3-Methylcholanthreen	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-Nitrosodimethylamine (voor hoge concentraties van S9)	62-75-9	200-549-8
		Benzo[a]pyreen	50-32-8	200-028-5

Ook andere geschikte referentiestoffen kunnen als positieve controle worden gebruikt, bijvoorbeeld 5-broom-2'-deoxyuridine (CAS-nr. 59-14-3 en Einecs-nr. 200-415-9) als het laboratorium over referentiegegevens uit het verleden beschikt. Waar mogelijk dient het gebruik van stoffen uit een verwante chemische klasse als positieve controle te worden overwogen.

Er dienen negatieve controles in het experiment te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel of het medium wordt toegediend en die verder op dezelfde manier als de testgroepen worden behandeld. Daarnaast moeten er ook controles worden gebruikt waaraan niets wordt toegediend, tenzij in het verleden reeds is aangetoond dat het gekozen oplosmiddel geen schadelijke of mutagene effecten veroorzaakt.

### 1.4.3. Uitvoering

#### 1.4.3.1. Behandeling met de teststof

Delende cellen worden zowel met als zonder metabole activering aan de teststof blootgesteld. De blootstelling moet gedurende een geschikte periode worden uitgevoerd (meestal is drie tot zes uur voldoende). De blootstelling kan een of meer cecycli beslaan.

Voor elke concentratie kan de bepaling met één behandelde cultuur of in duplo worden uitgevoerd. Wanneer één cultuur wordt gebruikt, moet het aantal concentraties worden verhoogd om ervoor te zorgen dat een afdoende aantal culturen kan worden geanalyseerd (d.w.z. ten minste acht analyseerbare concentraties). Voor de negatieve controle (oplosmiddel) moeten duploculturen worden gebruikt.

Bij het testen van gasen of vluchtige stoffen moet een daarvoor geschikte methode worden gevolgd, bijvoorbeeld in een gesloten kweekvat (21)(22).

#### 1.4.3.2. *Meting van de overleving, de levensvatbaarheid en de mutantfrequentie*

Aan het eind van de blootstellingsperiode worden de cellen gewassen en gekweekt om de overleving te bepalen en expressie van het mutantfenotype mogelijk te maken. Meestal wordt na de behandelingsperiode begonnen met de meting van de cytotoxiciteit door bepaling van de relatieve kloneringsefficiëntie (overleving) of de relatieve totale groei van de culturen.

Voor elke locus is er een bepaalde minimale tijd nodig om een vrijwel optimale fenotypische expressie van de geïnduceerde mutaties mogelijk te maken (voor HPRT en XPRT is ten minste zes tot acht dagen nodig en voor TK ten minste twee dagen). De cellen worden gekweekt in medium met en zonder de selecterende stof(fen) om respectievelijk het aantal mutanten en de kloneringsefficiëntie te bepalen. Aan het eind van de expressieperiode wordt een begin gemaakt met de meting van de levensvatbaarheid (gebruikt voor de berekening van de mutantfrequentie) door uitplating in het niet-selectieve medium.

Als de teststof positief reageert of de TK<sup>+/−</sup>-test met L5178Y, moet bij ten minste een van de testculturen (de hoogste positieve concentratie) en bij de negatieve en positieve controles de grootte van de kolonies worden geïnventariseerd. Als de teststof negatief reageert op de TK<sup>+/−</sup>-test met L5178Y, moet bij de negatieve en positieve controles de grootte van de kolonies worden geïnventariseerd. Als de TK<sup>+/−</sup>-test met TK6 wordt gebruikt, kan de grootte van de kolonies ook worden geïnventariseerd.

## 2. **GEGEVENS**

### 2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

Er moeten gegevens worden verstrekt over de bepaling van de cytotoxiciteit en de levensvatbaarheid, het aantal kolonies en de mutantfrequentie bij de behandelde en de controleculturen. Als de teststof positief reageert op de TK<sup>+/−</sup>-test met L5178Y, moeten de kolonies bij ten minste één concentratie van de teststof (de hoogste positieve concentratie) en bij de negatieve en positieve controles worden gescoord aan de hand van de criteria voor grote en kleine kolonies. Er is een gedetailleerde analyse gemaakt van de moleculaire en cytogenetische aard van zowel grote als kleine mutantkolonies (23)(24). Bij de TK<sup>+/−</sup>-test worden de kolonies gescoord aan de hand van de criteria voor normale groei (grote kolonies) en langzame groei (kleine kolonies) (25). Mutantcellen die de omvangrijkste genetische beschadigingen hebben opgelopen, hebben een langere verdubbelingstijd en vormen derhalve kleine kolonies. De omvang van deze beschadiging varieert meestal van verlies van het hele gen tot karyotypisch zichtbare chromosoomafwijkingen. Er is een verband gelegd tussen mutanten met kleine kolonies en chemische stoffen die grootschalige chromosoomafwijkingen induceren (26). Minder ernstig aangetaste mutantcellen hebben een groeitempo dat vergelijkbaar is met de oudercellen en vormen grote kolonies.

De overleving (relatieve kloneringsefficiëntie) of de relatieve totale groei moet worden vermeld. De mutantfrequentie moet worden uitgedrukt als de verhouding tussen het aantal mutantcellen en het aantal overlevende cellen.

De gegevens moeten voor elke cultuur apart worden verstrekt. Daarnaast moet er een overzicht van alle gegevens in tabelvorm worden samengesteld.

Een duidelijk positieve reactie hoeft niet te worden bevestigd. Bij onduidelijke resultaten moet nader onderzoek worden gedaan, bij voorkeur onder gewijzigde experimentele omstandigheden. Negatieve resultaten moeten per geval worden bevestigd. Wanneer een bevestiging van negatieve resultaten niet nodig wordt geacht, moet daarvoor een motivering worden gegeven. Bij vervollexperimenten na onduidelijke of negatieve resultaten dient wijziging van parameters te worden overwogen om de bepaling uit te breiden tot een bredere scala van omstandigheden. Parameters die voor wijziging in aanmerking komen zijn bijvoorbeeld de concentratie-intervallen en de omstandigheden bij metabole activering.

### 2.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Er zijn verschillende criteria om tot een positief resultaat te besluiten, zoals een concentratieafhankelijke of een reproduceerbare stijging van de mutantfrequentie. In eerste instantie moet naar de biologische relevantie van de resultaten worden gekeken. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt. Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn.

Indien de resultaten voor een teststof niet aan bovenstaande criteria voldoen, wordt de stof in dit systeem als niet-mutageen beschouwd.

Hoewel de meeste studies duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt herhaald, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de in-vitrogenmutatietest met zoogdiercellen wijzen erop dat de teststof in de gebruikte gekweekte zoogdiercellen genmutaties induceert. Het duidelijkst is een positieve concentratieafhankelijke respons die reproduceerbaar is. Negatieve resultaten wijzen erop dat de stof onder de testomstandigheden in de gebruikte gekweekte zoogdiercellen geen genmutaties induceert.

### 3. **RAPPORTAGE**

#### TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

##### Oplosmiddel/Medium:

- motivering voor de keuze van het oplosmiddel/medium;
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend.

##### Cellen:

- aard en herkomst van de cellen;
- aantal celculturen;
- aantal overentingen, indien van toepassing;
- methoden om de celcultuur in leven te houden, indien van toepassing;
- afwezigheid van mycoplasma.

##### Testomstandigheden:

- achtergrond voor de keuze van de concentraties en het aantal culturen, bijvoorbeeld gegevens over de cytotoxiciteit en beperkte oplosbaarheid, indien beschikbaar;
- samenstelling van het medium, CO<sub>2</sub>-concentratie;
- concentratie van de teststof;
- toegevoegd volume medium en teststof;
- incubatietemperatuur;
- incubatietijd;
- duur van de behandeling;
- celdichtheid bij de behandeling;
- aard en samenstelling van het metabool activeringssysteem, met inbegrip van aanvaardbaarheidscriteria;
- positieve en negatieve controles;
- lengte van de expressieperiode (met vermelding van het aantal geënte cellen en schema's voor enting en overenting, indien van toepassing);
- selecterende stoffen;
- criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is;

- methoden die zijn gebruikt om het aantal levensvatbare en mutantcellen te bepalen;
- definitie van kolonies van een bepaalde omvang en aard (bv. criteria voor „kleine” en „grote” kolonies).

Resultaten:

- tekenen van toxiciteit;
- neerslagverschijnselen;
- gegevens over de pH en de osmolaliteit tijdens de blootstelling aan de teststof, indien bepaald;
- grootte van een gescoorde kolonie voor ten minste de negatieve en positieve controles;
- mogelijkheden van het laboratorium voor de detectie van mutanten met een kleine kolonie bij de TK<sup>+/+</sup>-test met L5178Y, indien van toepassing;
- indien mogelijk het verband tussen dosis en respons;
- eventuele statistische analyses;
- gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles;
- gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking;
- mutantfrequentie.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

#### 4. REFERENTIES

- (1) Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). *Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- (2) Chu, E.H.Y. and Malling, H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells In Vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 61, pp. 1306-1312.
- (3) Liber, H.L. and Thilly, W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts. *Mutation Res.*, 94, pp. 467-485.
- (4) Moore, M.M., Harington-Brock, K., Doerr, C.L. and Dearfield, K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. *Mutagenesis*, 4, pp. 394-403.
- (5) Aaron, C.S., and Stankowski, Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. *Mutation Res.*, 223, pp. 121-128.
- (6) Aaron, C.S., Bolesfoldi, G., Glatt, H.R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr.L.F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.*, 312, pp. 235-239.
- (7) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257, pp. 147-204.
- (8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavournain, K. H. (1983). Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.*, 115, pp. 225-251.
- (9) Li, A.P., Gupta, R.S., Heflich, R.H. and Wasson, J.S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.*, 196, pp. 17-36.

- (10) Li, A.P., Carver, J.H., Choy, W.N., Hsie, A.W., Gupta, R.S., Loveday, K.S., ÓNeill, J.P., Riddle, J.C., Stankowski, L.F.Jr. and Yang, L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. *Mutation Res.*, 189, pp. 135-141.
- (11) Liber, H.L., Yandell, D.W. and Little, J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. *Mutation Res.*, 216, pp. 9-17.
- (12) Stankowski, L.F.Jr., Tindall, K.R., and Hsie, A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate — and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate — and ICR-191 Induced Mutation in AS52 Cells. *Mutation Res.*, 160, pp. 133-147.
- (13) Turner, N.T., Baltson, A.G. and Clive, D. (1984). Procedures for the L5178Y/TK<sup>+/+</sup> - TK<sup>+/+</sup> Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay. In: Kilbey, B.J. et al (eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.
- (14) Arlett, C.F., Smith, D.M., Clarke, G.M., Green, M.H.L., Cole, J., McGregor, D.B. and Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J., Ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.
- (15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. *Mutation Res.*, 46, pp. 365-373.
- (16) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.
- (17) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson A.G. and Brown M.M.M. (1979). Validation and Characterisation of the L5178Y/TK<sup>+/+</sup> Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutat. Res.*, 59, pp. 61-108.
- (18) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.
- (19) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in: *In Vitro Genotoxicity Assays. Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (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., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (21) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooley, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, pp. 91-103.
- (22) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795-801.
- (23) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A. and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, pp. 51-55.
- (24) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFT<sup>r</sup>) Mutants of L5178Y/TK<sup>+/+</sup> Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151, pp. 161-174.
- (25) Yandell, D.W., Dryja, T.P. and Little, J.B. (1990). Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells. *Mutation Res.*, 229, pp. 89-102.
- (26) Moore, M.M. and Doerr, C.L. (1990). Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK<sup>+/+</sup> - 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells. *Mutagenesis*, 5, pp. 609-614.

**1. METHODE****1.1. Inleiding**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

**1.2. Definitie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

**1.3. Referentiestoffen**

Geen.

**1.4. Principe van de onderzoekmethode**

Her onderzoek naar DNA-herstelsynthese (Unscheduled DNA Synthesis, UDS) meet de DNA-herstelsynthese na excisie en verwijdering van een DNA-streng die de door chemische en fysische agentia geïnduceerde beschadiging bevat. De proef is gebaseerd op de opname van met tritium gemerkt thymidine ( $^3\text{H-TdR}$ ) in het DNA van zoogdierencellen die zich niet in de S-fase van de celcyclus bevinden. De opname van  $^3\text{H-TdR}$  kan worden bepaald met behulp van autoradiografie of van vloeistof scintillatie telling (liquid scintillation counting, LSC) van DNA uit behandelde cellen. Tenzij primaire rattenhepatocyten worden gebruikt, worden de zoogdierencellen in cultuur met en zonder een exogeen metabool activeringssysteem met de teststof behandeld. UDS kan eveneens in in-vivo-systemen worden gemeten.

**1.5. Kwaliteitscriteria**

Geen.

**1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode***Vorbereidingen*

Teststoffen en controle- of referentiestoffen moeten in groeimedium worden bereid of opgelost of gesuspendeerd in geschikte media en voor gebruik in de proef verder worden verdund in groeimedium. De uiteindelijke concentratie van het medium mag geen effect hebben op de levensvatbaarheid van de cel.

Primaire culturen van rattenhepatocyten, menselijke lymfocyten of permanente cellijnen (bij voorbeeld menselijke diploïde fibroblasten) kunnen voor deze toets worden gebruikt.

De cellen moeten met en zonder geschikt metabool activeringssysteem aan de teststof worden blootgesteld.

*Proefomstandigheden***Aantal culturen**

Er zijn ten minste twee celculturen voor autoradiografie en zes (of minder als dit wetenschappelijk verantwoord is) celculturen voor LSC-UDS metingen vereist voor elk punt in de proef.

**Gebruik van negatieve en positieve controles**

Bij elke proef moeten parallelle positieve en negatieve (onbehandelde en/of medium) controles met en zonder metabole activering worden uitgevoerd.

Voorbeelden van positieve controles voor de proef met rattenhepatocyten zijn onder meer 7,12-dimethylbenzothraceen (7,12-DMBA) of 2-acetylaminofluoreen (2-AAF). Voor gevestigde cellijnen is 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO) een voorbeeld van een positieve controle voor autoradiografie en LSC-proeven, uitgevoerd zonder metabole activering; wanneer metabole activeringssystemen worden gebruikt is N-dimethylnitrosamine een positieve controleverbinding.

### Blootstellingsconcentratie

Er zijn meerdere concentraties van de teststof vereist die voldoende gespreid moeten zijn om de respons te bepalen. De hoogste concentratie moet een cytotoxisch effect veroorzaken. In water relatief onoplosbare stoffen dienen tot de uiterste oplosbaarheids grens te worden onderzocht. Voor volledig in water oplosbare niet-toxische stoffen dient de hoogste concentratie per geval te worden bepaald.

### Cellen

Om de culturen in stand te houden moeten geschikte groeimedia, CO<sub>2</sub>-concentraties, temperatuur en vochtigheidsgraad worden gebruikt. Permanente cellijnen moeten regelmatig worden gecontroleerd op Mycoplasma-contaminatie.

### Metabole activering

Voor primaire hepatocytculturen wordt geen metabool activeringssysteem gebruikt. Permanente cellijnen en lymfocyten worden met en zonder geschikt metabool activeringssysteem aan de teststof blootgesteld.

### Uitvoering

#### Bereiding van culturen

Permanente cellijnen worden uit stamculturen gegenereerd (bij voorbeeld door trypsinebehandeling of door uitspoelen), met een geschikte dichtheid op kweekflessen uitgezaaid en geïncubeerd bij 37 °C.

Korte levende culturen rattenhepatocyten worden gekweekt door pas gedissocieerde hepatocyten in een geschikt medium te laten vasthechten aan de groeiende laag.

Menselijke lymfocytculturen worden met behulp van geschikte technieken gemaakt.

### Behandeling van de culturen met de teststof

#### Primaire rattenhepatocyten

Pas geïsoleerde rattenhepatocyten worden gedurende een geschikte periode met de teststof behandeld in een medium dat <sup>3</sup>H-TdR bevat. Na de behandelingsperiode wordt medium van de cellen verwijderd, de cellen worden gespoeld, gefixeerd en gedroogd. De glaasjes worden in een autoradiografische emulsie gedoopt, blootgesteld, ontwikkeld (als alternatief kan ook stripping film worden gebruikt), gekleurd en geteld.

#### Permanente cellijnen en lymfocyten

*Autoradiografische methode:* de celculturen worden voor een geschikte duur aan de teststof blootgesteld en daarna behandeld met <sup>3</sup>H-TdR. De blootstellingstijd wordt bepaald door de aard van de stof, de activiteit van het metaboliseringssysteem en het soort cel. Om de UDS-piek op te sporen, moet het <sup>3</sup>H-TdR hetzij samen met de teststof hetzij binnen enkele minuten na de blootstelling aan de teststof worden toegevoegd. De keuze tussen deze twee methoden is afhankelijk van een mogelijke interactie tussen teststof en <sup>3</sup>H-TdR. Ten einde een onderscheid te maken tussen UDS en semiconservatieve DNA-replicatie kan dit laatste verschijnsel worden geremd door toepassing van een arginine-deficient medium, laag serumgehalte of door hydroxyurea in het cultuurmedium.

*LSC-metingen van UDS:* vóór de behandeling met de teststof moet zoals hierboven beschreven worden voorkomen dat de cellen in de S-fase treden; nadien worden de cellen aan de teststof blootgesteld overeenkomstig de beschrijving voor autoradiografie. Na de incubatieperiode wordt het DNA uit de cellen gehaald en worden het totale DNA-gehalte en de <sup>3</sup>H-TdR-opname bepaald.

Opgemerkt wordt dat bij gebruik van menselijke lymfocyten in de hierboven beschreven methoden de semiconservatieve DNA-replicatie niet moet worden onderdrukt in ongestimuleerde culturen.



### Autoradiografische analyse

Voor de UDS-analyse van cellen in cultuur worden de S-fase kernen niet geteld. Per concentratie dienen ten minste 50 cellen te worden geteld. Voor de telling dienen de glaasjes te worden gecodeerd. Op elk glaasje moeten ver uiteenliggende, willekeurig gekozen velden worden geteld. De opgenomen hoeveelheid  $^3\text{H-TdR}$  in het cytoplasma moet worden bepaald door telling van drie gebieden ter grootte van een kern in het cytoplasma van elke getelde cel.

### LSC-analyse

Voor de LSC-UDS-analyse moet van elke concentratie en van de controlepopulaties een passend aantal culturen worden gebruikt.

Alle resultaten moeten in een onafhankelijke proef worden bevestigd.

## 2. GEGEVENS

De gegevens moeten in tabellen worden samengevat.

### 2.1. Autoradiografische analyse

De mate van  $^3\text{H-TdR}$ -opname in het cytoplasma en het aantal aangetroffen korrels op de celkern moeten afzonderlijk worden vermeld.

Gemiddelde, mediaan en modus kunnen worden gebruikt om de distributie van de  $^3\text{H-TdR}$ -opname in het cytoplasma en het aantal korrels per kern te beschrijven.

### 2.2. LSC-analyse

Voor LSC-analyses moet de  $^3\text{H-TdR}$ -opname worden vermeld in  $\text{dpm}/\mu\text{g DNA}$ . Het gemiddeld aantal  $\text{dpm}/\mu\text{g DNA}$  met standaarddeviatie kan worden gebruikt om de distributie van de opname te beschrijven.

De gegevens moeten met behulp van een geschikte statistische methode worden geëvalueerd.

## 3. VERSLAGGEVING

### 3.1. Verslag van de proefneming

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- gebruikte cellen, dichtheid en passagegetal op het ogenblik van de behandeling, aantal celculturen;
- toegepaste methode voor instandhouding van de celculturen met inbegrip van medium, temperatuur en  $\text{CO}_2$ -concentratie;
- teststof, medium, concentraties en verantwoording voor de in de test gebruikte concentraties;
- gegevens over het metabole activeringssysteem;
- behandelingsschema;
- positieve en negatieve controles;

- toegepaste autoradiografische techniek;
- toegepaste methode om te voorkomen dat de cellen in de S-fase treden;
- toegepaste methode voor DNA-extractie en bepaling van het totale DNA-gehalte in LSC-analyses;
- indien mogelijk de dosis-responsverhouding;
- statistische evaluatie;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. **LITERATUUR**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

---

1. **METHODE**

1.1. **Inleiding**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. **Definitie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. **Referentiestoffen**

Geen.

1.4. **Principe van de onderzoekmethode**

De zusterchromatiden-uitwisselingstest (Sister Chromatid Exchange, SCE), is een kortdurende proef voor het opsporen van reciproke DNA-uitwisselingen tussen twee zusterchromatiden van een duplicerend chromosoom. SCE's zijn onderlinge uitwisselingen van DNA-replicatieproducten in ogenschijnlijk homologe loci. Vermoed wordt dat het uitwisselingsproces verband houdt met een DNA-breuk en -hereniging, ofschoon weinig bekend is over de moleculaire basis ervan. Om SCE's op te sporen moet een middel beschikbaar zijn om zusterchromatiden verschillend te merken. Dat kan gebeuren door gedurende twee cycli broomdeoxyuridine (BrdU) in het chromosomaal DNA in te brengen.

In-vitro-zoogdierencellen worden met en zonder een exogeen metabool activeringssysteem verkregen uit zoogdieren aan de teststof blootgesteld en gedurende twee replicatiecycli in een BrdU-bevatend medium gekweekt. Na behandeling met een „spindle“-remmer (bij voorbeeld colchicine) om cellen in een metafaseachtig stadium van de mitose (c-metafase) te verzamelen, worden de cellen gewonnen en chromosoompreparaten gemaakt.

1.5. **Kwaliteitscriteria**

Geen.

1.6. **Beschrijving van de onderzoekmethode**

*Voorbereidingen*

- Voor de test kunnen primaire culturen (menselijke lymfocyten) of gevestigde cellijnen (bij voorbeeld ovariumcellen van de Chinese hamster) worden gebruikt. De cellijnen moeten worden gecontroleerd op Mycoplasma-contaminatie.
- Er moeten geschikte cultuurmedia en incubatieomstandigheden worden gebruikt (bij voorbeeld temperatuur, cultuurflessen, CO<sub>2</sub>-gehalte en vochtigheidsgraad).
- Vóór de behandeling van de cellen dienen de teststoffen te worden klaargemaakt in cultuurmedia of opgelost of gesuspenseerd in geschikte middelen. De uiteindelijke concentratie van een medium in het cultuursysteem mag geen significante invloed hebben op de levensvatbaarheid of de groeisnelheid van de cel en effecten op de SCE-frequentie moeten door middel van een oplosmiddelcontrole worden nagegaan.
- De cellen moeten met en zonder exogeen metabool activeringssysteem bereid uit zoogdieren aan de teststoffen worden blootgesteld. Indien evenwel cellen met intrinsieke metabole activiteit worden gebruikt, moeten de aard en de omvang van de activiteit geschikt zijn voor de te onderzoeken chemische klasse.

*Proefomstandigheden*

**Aantal culturen**

Voor elk punt in de proef moeten culturen ten minste in tweevoud worden gebruikt.

## Gebruik van positieve en negatieve controles

Positieve controles waarbij gebruik wordt gemaakt van een direct werkende stof en een stof die metabole activering vereist, moeten bij elke proefneming worden uitgevoerd: er dient eveneens een mediumcontrole te worden gebruikt.

Hierna volgen voorbeelden van stoffen die als positieve controle kunnen worden gebruikt:

- direct werkende stof:
  - ethylmethaansulfonaat,
- niet-rechtstreeks werkende stof:
  - cyclofosfamide.

Waar dat van toepassing is, kan ook een aanvullende positieve controle van dezelfde chemische klasse als de te onderzoeken stof worden meegenomen.

## Blootstellingsconcentratie

Er zijn ten minste drie behoorlijk gespreide concentraties van de teststof vereist. De hoogste concentratie moet een duidelijk toxisch effect veroorzaken en moet laag genoeg zijn om een goede celrepletie te doen plaatsvinden. In water relatief onoplosbare stoffen dienen met behulp van geschikte methoden tot de uiterste oplosbaarheids grens te worden onderzocht. Voor volledig in water oplosbare niet-toxische stoffen dient de hoogste concentratie per geval te worden bepaald.

## *Uitvoering*

### Bereiding van culturen

Permanente cellijnen worden gegeneerd uit stamculturen (bij voorbeeld door trypsinebehandeling of uitspoelen), met een geschikte dichtheid uitgezaaid in kweekflessen en geïncubeerd bij 37°C. Voor eenlagige culturen moet het aantal cellen per kweekfles worden aangepast zodat de culturen op het tijdstip van winning niet veel meer dan 50 % confluent zijn. Anderzijds kunnen cellen worden gebruikt in een suspensiecultuur. Culturen van menselijke lymfocyten worden met behulp van geschikte technieken opgezet uit gehepariniseerd bloed en bij 37°C geïncubeerd.

### Behandeling

Cellen in exponentiële groeifase worden voor een geschikte duur blootgesteld aan de teststof; in de meeste gevallen volstaan een tot twee uur maar in bepaalde gevallen mag de behandelingstijd worden verlengd tot maximaal twee complete celcycli. Cellen zonder toereikende intrinsieke metabole activiteit moeten met en zonder geschikt metabool activeringssysteem aan de teststof worden blootgesteld. Na de blootstellingsperiode worden de teststoffen van de cellen gewassen en worden de cellen gedurende twee replicatieronden in aanwezigheid van BrdU in cultuur gebracht. Een andere methode is de cellen gedurende de volledige cultuurtijd van twee celcycli gelijktijdig bloot te stellen aan de teststof en aan BrdU.

Culturen van menselijke lymfocyten worden behandeld terwijl ze zich in een semisynchrone staat bevinden.

De cellen worden geanalyseerd in de tweede deling na de behandeling omdat het dan zeker is dat de gevoeligste fasen van de celcyclus aan de teststof zijn blootgesteld. Alle culturen waaraan BrdU is toegevoegd, moeten tot aan de winning van de cellen in het donker of in geschemerd licht van gloeilampen worden behandeld, ten einde de fotolyse van BrdU-bevattend DNA tot een minimum te beperken.

### Winning van de cellen

De celculturen worden een tot vier uren voor het winnen behandeld met een „spindle“-remmer (bij voorbeeld colchicine). Elke cultuur wordt afzonderlijk gewonnen en bewerkt met het oog op het prepareren van chromosomen.

### Chromosoompreparatie en kleuring

Chromosoompreparaten worden gemaakt met behulp van standaardcytogenetische technieken. De glaasjes kunnen met behulp van diverse technieken (bij voorbeeld fluorescentie plus Giemsa-methode) worden gekleurd om de SCE's aan te tonen.

## Analyse

Het aantal te analyseren cellen dient te zijn gebaseerd op de door controleproeven bepaalde spontane SCE-frequentie. Gewoonlijk worden ten minste 25 goed gespreide metafasen per cultuur geanalyseerd op SCE's. De glaasjes worden voor de analyse gecodeerd. Voor menselijke lymfocyten worden uitsluitend metafasen geanalyseerd die 46 centromeren bevatten. Voor gevestigde cellijnen worden uitsluitend metafasen geanalyseerd die  $\pm 2$  centromeren van het modale aantal bevatten. Er moet worden vermeld of een centromere verandering van kenmerk als SCE wordt beschouwd of niet. De resultaten moeten in een onafhankelijke proef worden bevestigd.

## 2. GEGEVENS

De gegevens moeten in tabellen worden samengevat. Voor alle behandelde en controleculturen moet het aantal SCE's in elke metafase en het aantal SCE's per chromosoom in elke metafase afzonderlijk worden vermeld.

De gegevens moeten met behulp van een geschikte statistische methode worden geëvalueerd.

## 3. VERSLAGGEVING

### 3.1. Verslag van de proefneming

In het verslag van de proefneming moeten de volgende gegevens worden opgenomen:

- gebruikte cellen, methoden voor het in stand houden van de celculturen;
- proefomstandigheden: samenstelling van cultuurmedia, CO<sub>2</sub>-concentratie, concentratie van de teststof, gebruikt oplosmiddel, incubatietemperatuur, behandelingstijd, toegepaste „spindle”-remmer, de concentratie ervan en de duur van de behandeling, gebruikte soort metabool activeringssysteem bereid uit zoogdieren, positieve en negatieve controles;
- aantal celculturen per punt in de proef;
- nadere gegevens omtrent de toegepaste techniek voor het prepareren van glaasjes;
- aantal geanalyseerde metafasen (de gegevens dienen voor elke cultuur afzonderlijk te worden vermeld);
- gemiddeld aantal SCE's per metafase en per chromosoom (de gegevens dienen voor elke cultuur afzonderlijk te worden vermeld);
- criteria voor het tellen van SCE's;
- verantwoording voor de gekozen dosis;
- dosis-responsverhouding (indien mogelijk);
- statistische evaluatie;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

### 3.2. Evaluatie en interpretatie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

## 4. LITERATUUR

Zie Algemene inleiding — Deel B.

## B.20 GESLACHTSGEBONDEN RECESSIEVE LETALITEITSTEST MET DROSOPHILA MELANOGASTER

### 1. METHODE

#### 1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

#### 1.2. Definitie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

#### 1.3. Referentiestoffen

Geen.

#### 1.4. Principe van de onderzoekmethode

Het onderzoek naar geslachtsgebonden recessieve letaliteit (Sex-linked recessive lethality, SLRL) waarbij *Drosophila melanogaster* wordt gebruikt, spoort mutaties, zowel puntmutaties als kleine deleties, in de geslachtslijn van het insect op. Deze test is een voorwaartse mutatietest waarmee kan worden gezocht naar mutaties in circa 800 loci op het X-chromosoom. Dat is circa 80% van alle X-chromosoomloci. Het X-chromosoom vertegenwoordigt circa een vijfde van het gehele haploïde genoom.

Mutaties in het X-chromosoom van *Drosophila melanogaster* komen fenotypisch tot uiting bij mannetjes die drager zijn van het mutant gen. Indien de mutatie letaal is in de homozygote staat wordt dit afgeleid uit het ontbreken van een klasse mannelijke nakomelingen van de twee die normaal door een heterozygoot vrouwtje worden voortgebracht. Bij de SLRL-toets wordt van deze feiten gebruik gemaakt door middel van speciaal gemerkte en gerangschikte chromosomen.

#### 1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

#### 1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

##### *Vorbereidingen*

##### Stamculturen

Mannetjes van een goed gedefinieerd wild-type stamcultuur en vrouwtjes van de Muller-5 stamcultuur kunnen worden gebruikt. Andere goed gemerkte vrouwelijke stamculturen met meermaals geïnverteerde X-chromosomen kunnen eveneens worden gebruikt.

##### Teststof

De teststoffen dienen in water te worden opgelost. In water onoplosbare stoffen kunnen in geschikte media worden opgelost of gesuspenderd (bij voorbeeld een mengsel van ethanol en Tween-60 of 80) en voor de toediening worden verdund in water of een zoutoplossing. Dimethylsulfoxyde (DMSO) moet als medium worden vermeden.

##### Aantal dieren

De proef moet worden opgezet met een vooraf bepaalde gevoeligheid en statistische kracht. De tijdens de desbetreffende controle waargenomen spontane mutatiefrequentie zal het aantal te analyseren behandelde chromosomen in sterke mate beïnvloeden.

##### Toedieningsweg

Blootstelling kan oraal geschieden, door injectie of door blootstelling aan gassen of dampen. De teststof kan ook als voedsel worden toegediend in een suikeroplossing. Waar dat nodig is kunnen de stoffen worden opgelost in een 0,7% natriumchlorideoplossing en in de thorax of abdomen worden geïnjecteerd.

##### Gebruik van negatieve en positieve controles

Negatieve (medium) en positieve controles moeten worden meegenomen. Indien evenwel in het laboratorium geschikte controlegegevens uit het verleden beschikbaar zijn, behoeven geen parallele controles te worden uitgevoerd.

## Blootstellingsniveau

Drie blootstellingsniveaus moeten worden gebruikt. Voor een voorbereidende beoordeling kan met een blootstellingsniveau van de teststof worden volstaan. Dat blootstellingsniveau is hetzij de hoogste getolereerde concentratie of de concentratie waarbij zich enige tekenen van toxiciteit voordoen. Voor niet-toxische stoffen dient een blootstelling tot maximale concentratie die uitvoerbaar is te worden gebruikt.

### *Uitvoering*

Wild-type mannetjes (drie tot vijf dagen oud) worden met teststof behandeld en individueel gepaard met een overmaat aan niet-gedekte vrouwtjes van de Muller-5 stamcultuur of van een andere goed gemerkte (met meervoudig geïnverteerde X-chromosomen) stamcultuur. Om de twee à drie dagen worden de vrouwtjes vervangen door andere niet-gedekte vrouwtjes, ten einde de volledige geslachtsceclus te bestrijken. Bij de nakomelingen van deze vrouwtjes worden letale effecten opgespoord die overeenstemmen met de effecten op rijp sperma, spermatiden in vroeg, midden of laat stadium, spermatocyten en spermatogonia op het ogenblik van de behandeling.

Heterozygote  $F_1$ -vrouwtjes uit de hierboven beschreven kruising worden individueel gepaard (dat wil zeggen een vrouwtje per fles) met hun broertjes. In de  $F_2$ -generatie wordt in elke cultuur de afwezigheid van wild-type mannetjes onderzocht. Indien een cultuur lijkt te zijn ontstaan uit een  $F_1$ -vrouwtje dat een letaal kenmerk in het ouderlijk X-chromosoom draagt (dat wil zeggen er worden geen mannetjes met het behandelde chromosoom aangetroffen), dienen dochters van dat vrouwtje met hetzelfde genotype te worden onderzocht, ten einde na te gaan of de letaliteit in de volgende generatie wordt herhaald.

## 2. GEGEVENS

De gegevens moeten in tabellen worden samengevat met vermelding van het aantal geteste X-chromosomen, het aantal niet-vruchtbare mannetjes en het aantal letale chromosomen voor elke blootstellingsconcentratie en voor elke paringsperiode van elk mannetje. Per mannetje dient het aantal groepen van verschillende omvang te worden vermeld. De resultaten moeten in een afzonderlijke proef worden bevestigd.

De geslachtsgebonden recessieve letaliteitstest moet met behulp van geschikte statistische methoden worden geëvalueerd. Groeperingen van uit een mannetje ontstane recessief letalen moeten met behulp van een geschikte statistische methode worden behandeld en geëvalueerd.

## 3. VERSLAGGEVING

### 3.1. Verslag van de proefneming

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- stamcultuur: gebruikte *Drosophilastammen*, leeftijd van de insecten, aantal behandelde mannetjes, aantal steriele mannetjes, aantal gevormde  $F_2$ -culturen, aantal  $F_2$ -culturen zonder nakomelingen, aantal in elke geslachtsceclus aangetroffen chromosomen met een letaal kenmerk;
- criteria voor de bepaling van de omvang van de behandelde groepen;
- proefomstandigheden: gedetailleerde beschrijving van het behandelings- en bemonsteringsschema, blootstellingsniveaus, toxiciteitsgegevens, negatieve (oplosmiddel) en positieve controles (waar dat van toepassing is);
- criteria voor het tellen van letale mutaties;
- blootstelling/effectverhouding (indien mogelijk);
- statistische evaluatie;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

### 3.2. Evaluatie en interpretatie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

## 4. LITERATUUR

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1. **METHODE**

1.1. **Inleiding**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. **Definitie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. **Referentiestoffen**

Geen.

1.4. **Principe van de onderzoeksmethode**

Cultuursystemen van zoogdierencellen kunnen worden gebruikt voor het onderzoek van fenotypische veranderingen in vitro die worden geïnduceerd door chemische stoffen die betrokken zijn bij maligne transformaties in vivo. Algemeen gebruikte cellen zijn onder meer C3H10T<sup>1/2</sup>, 3T3, SHE, en Fisher-rat. De test is gebaseerd op wijzigingen in de celmorfologie, focusvorming of wijzigingen in de afhankelijkheid van de aanhechting in halfvast agar. Er bestaan andere, minder gebruikte systemen die andere fysiologische of morfologische wijzigingen in cellen ten gevolge van blootstelling aan carcinogene chemische stoffen opsporen. Van geen van de eindpunten van de in-vitro-proef staat vast dat er een mechanistische band is met kanker. Met enkele testsystemen kunnen tumorpromotoren worden opgespoord. Cytotoxiciteit kan worden bepaald door meting van het effect van de teststof op de kolonievorming (cloningefficiëntie) of de groeisnelheid van de culturen. De cytotoxiciteitsbepaling kan worden gebruikt om vast te stellen dat blootstelling aan de teststof een toxisch effect heeft gehad, maar kan niet in alle testen worden gebruikt om de transformatiefrequentie te berekenen, aangezien voor sommige testen een langere incubatie en/of opnieuw uitplaten noodzakelijk kunnen zijn.

1.5. **Kwaliteitscriteria**

Geen.

1.6. **Beschrijving van de onderzoeksmethode**

*Vorbereidingen*

**Cellen**

Een verscheidenheid aan cellijnen of primaire cellen is beschikbaar afhankelijk van de toegepaste transformatietest. De onderzoeker moet nagaan of de cellen voor de uit te voeren proef na blootstelling aan bekende carcinogenen de juiste fenotypische wijzigingen vertonen en dient ervoor te zorgen dat de validiteit en betrouwbaarheid van de in zijn laboratorium uitgevoerde test aangetoond en gedocumenteerd wordt.

**Medium**

De gebruikte media en proefomstandigheden dienen geschikt te zijn voor de uit te voeren transformatietesten.

**Teststof**

De teststof mag in cultuurmedia worden bereid of voor de behandeling van de cellen worden opgelost of gesuspendeerd in geschikte middelen. De uiteindelijke concentratie van het (oplos)middel in het cultuursysteem mag de levensvatbaarheid van de cellen, de groeisnelheid of de mate van voorkomen van transformaties niet beïnvloeden.

**Metabole activering**

De cellen dienen met en zonder geschikt metabool activeringssysteem aan de teststof te worden blootgesteld. Indien evenwel celsoorten worden gebruikt met een intrinsieke metabole activiteit, moet worden nagegaan of de aard van de activiteit geschikt is voor de onderzochte chemische klasse.



## **Gebruik van positieve en negatieve controles**

Voor elke proef moet een positieve controle worden uitgevoerd waarbij zowel een rechtstreeks werkende verbinding als een verbinding die metabole activering vereist, moeten worden meegenomen: er dient eveneens een negatieve (oplos)middelcontrole te worden gebruikt.

Hierna volgen voorbeelden van stoffen die als positieve controle kunnen worden gebruikt:

- Direct werkende stoffen:
  - ethylmethaansulfonaat,
  - $\beta$ -propiolacton;
- Verbindingen die metabole activering vereisen:
  - 2-acetylaminofluoreen,
  - 4-dimethylaminoazobenzeen,
  - 7,12-dimethylbenzanthraceen.

Wanneer dat van toepassing is, dient een aanvullende positieve controle van dezelfde chemische klasse als de teststof te worden uitgevoerd.

## **Blootstellingsconcentraties**

Meerdere concentraties van de teststof moeten worden gebruikt. Deze concentraties moeten een concentratieafhankelijk toxisch effect veroorzaken waarbij de hoogste concentratie een laag overlevingspeil geeft en de overleving in de laagste concentratie nagenoeg dezelfde is als die in de negatieve controle. In water relatief onoplosbare stoffen dienen met behulp van geschikte methoden tot de uiterste oplosbaarheidsgrens te worden onderzocht. Voor volledig in water oplosbare, niet-toxische stoffen dient de hoogste concentratie per geval te worden bepaald.

## *Uitvoering*

De cellen moeten voldoende lang worden blootgesteld. De tijd is afhankelijk van het toegepaste testsysteem en bij langere blootstellingstijden kan het noodzakelijk zijn een nieuwe dosis toe te dienen en gelijktijdig het medium te veranderen (met indien noodzakelijk een vers metabool activeringsmengsel). Cellen met een ontoereikende intrinsieke metabole activiteit moeten met en zonder een geschikt metabool activeringssysteem aan de teststof worden blootgesteld. Na de blootstellingsperiode wordt de teststof van de cellen gewassen en worden de cellen op cultuurmedia gebracht onder omstandigheden die gunstig zijn om het verschijnen van getransformeerde fenotypes te controleren en wordt de mate van voorkomen van de transformaties bepaald. Alle resultaten worden in een onafhankelijke proef bevestigd.

## **2. GEGEVENS**

De gegevens moeten in tabellen worden samengevat en kunnen naar gelang van de gebruikte toets in diverse vormen worden voorgesteld, bij voorbeeld plaattellingen, positieve platen of aantal getransformeerde cellen. Wanneer dat van toepassing is, dient de overleving te worden uitgedrukt als een percentage van het controleniveau en de transformatiefrequentie als het aantal transformaties per aantal overlevenden. De gegevens moeten met behulp van een geschikte statistische methode worden geëvalueerd.

## **3. VERSLAGGEVING**

### **3.1. Verslag van de proefneming**

In het verslag van de proef moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- gebruikt celype, aantal celculturen, methode voor het in stand houden van celculturen;
- proefomstandigheden: concentratie van de teststof, gebruikt (oplos)middel, incubatietemperatuur, incubatietijd, duur en frequentie van de behandeling, celdichtheid tijdens de behandeling, type van het gebruikte exogeen metabool activeringssysteem, positieve en negatieve controles, specificatie van het onderzochte fenotype, gebruikt selectief systeem (wanneer dat van toepassing is); verantwoording voor de keuze van de doses;

- gebruikte methode voor het tellen van het aantal levensvatbare en getransformeerde cellen;
- statistische evaluatie;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. **LITERATUUR**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

---

1. **METHODE**
- 1.1. **Inleiding**

Zie Algemene inleiding — Deel B.
- 1.2. **Definities**

Zie Algemene inleiding — Deel B.
- 1.3. **Referentiestoffen**

Geen.
- 1.4. **Principe van de onderzoekmethode**

Dominante letale effecten veroorzaken de dood van het embryo of van de foetus. De inductie van dominante letale mutaties door blootstelling aan een chemische stof wijst erop dat de stof het geslachtsweefsel van de proefdiersoort heeft aangetast. Algemeen wordt aangenomen dat dominante letale mutaties het gevolg zijn van beschadiging van de chromosomen (structurele en numerieke anomalieën). Als vrouwtjes worden behandeld, kan de dood van het embryo eveneens het gevolg zijn van toxische effecten.

In het algemeen worden mannetjes aan de teststof blootgesteld en met niet-behandelde, niet-gedekte vrouwtjes gepaard. De diverse geslachtsstadiïa kunnen door middel van geregelde intervallen in de paring afzonderlijk worden onderzocht. De toename van het aantal dode implantaten per vrouwtje in de behandelde groep in vergelijking met het aantal dode implantaten per vrouwtje in de controlegroep geeft het verlies na implantatie weer. Het verlies voor implantatie kan worden geschat op grond van tellingen van de corpora lutea of door het totale aantal implantaten per vrouwtje in de behandelde en de controlegroep met elkaar te vergelijken. Het totale dominante letale effect is de som van het verlies voor en na de implantatie. De berekening van het totale dominante letale effect is gebaseerd op de vergelijking van de levende implantaten per vrouwtje in de testgroep met de levende implantaten per vrouwtje in de controlegroep. Een vermindering van het aantal implantaten op bepaalde tijdstippen kan het gevolg zijn van het doodgaan van cellen (bij voorbeeld van spermatocyten en/of spermatogonia).
- 1.5. **Kwaliteitscriteria**

Geen.
- 1.6. **Beschrijving van de onderzoekmethode**

*Voorbereidingen*

Zo mogelijk moeten de teststoffen in een isotone zoutoplossing worden opgelost of gesuspenderd. Niet in water oplosbare chemische stoffen kunnen in geschikte (oplos)middelen worden opgelost of gesuspenderd. Het gebruikte (oplos)middel mag niet met de teststof interfereren en mag ook geen toxische effecten produceren. Er dienen verse bereidingen van de teststof te worden gebruikt.

*Proefomstandigheden*

*Toedieningsweg*

De teststof moet in het algemeen slechts eenmaal worden toegediend. Op grond van toxicologische gegevens kan een schema met herhaalde behandelingen worden gebruikt. De normale toedieningswegen zijn orale intubatie of intraperitoneale injectie. Andere toedieningswegen kunnen eveneens geschikt zijn.

*Proefdieren*

Ratten of muizen worden als proefdieren aanbevolen. Gezonde, geslachtelijk volledig rijpe dieren worden willekeurig ingedeeld in te behandelen groepen en controlegroepen.

## Aantal en geslacht

Er dient een passend aantal behandelde mannetjes te worden gebruikt, rekening houdend met de spontane variatie van het te onderzoeken biologische kenmerk. Het gekozen aantal moet gebaseerd zijn op de van tevoren vastgestelde detectiegevoeligheid en significantie. Zo moet bij voorbeeld bij een kenmerkende test het aantal mannetjes in elke dosisgroep voldoende zijn om per paringsinterval 30 à 50 drachtige vrouwtjes te hebben.

## Negatieve en positieve controles

In het algemeen moet elk experiment parallelle positieve en negatieve (oplos)middelcontroles omvatten. Indien aanvaardbare positieve controleresultaten uit het recente verleden van in hetzelfde laboratorium verrichte experimenten beschikbaar zijn, kunnen deze worden gebruikt in plaats van een parallelle positieve controle. Positieve controlestoffen moeten in een voldoende lage dosis (bij voorbeeld MMS, i.p., bij 10 mg/kg) worden gebruikt om de gevoeligheid van de test aan te tonen.

## Dosisniveaus

Normaliter moeten drie dosisniveaus worden gebruikt. De hoge dosis moet bij de behandelde dieren tekenen van toxiciteit of verminderde vruchtbaarheid teweegbrengen. In sommige gevallen kan met één enkele hoge dosis worden volstaan.

## Hoogste te testen dosis

Niet-toxische stoffen moeten in doses van 5 g/kg bij één enkele toediening of in doses van 1 g/kg/dag bij herhaalde toediening worden getest.

## Uitvoering

Er zijn diverse behandelingsschema's beschikbaar. Enkelvoudige toediening van de teststof is de meest toegepaste methode. Er kunnen ook andere behandelingsschema's worden gebruikt.

Na de behandeling laat men individuele mannetjes opeenvolgend na geschikte intervallen, met een of twee niet-behandelde, nog niet-gedekte vrouwtjes paren. De vrouwtjes moeten bij de mannetjes worden gelaten gedurende ten minste één volledige oestruscyclus of tot op het ogenblik dat de paring heeft plaatsgevonden, hetgeen wordt bepaald door de aanwezigheid van sperma in de vagina of door de aanwezigheid van een vaginale plug.

Het aantal paringen na de behandeling is afhankelijk van het behandelingsschema en moet groot genoeg zijn om alle geslachtsstadiën na de behandeling te kunnen onderzoeken.

De vrouwtjes worden in de tweede helft van de dracht gedood en de inhoud van de uterus wordt onderzocht om het aantal dode en levende implantaties te bepalen. Ook de eierstokken kunnen worden onderzocht om het aantal corpora lutea te bepalen.

## 2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten in tabellen worden weergegeven: aantal mannetjes, aantal drachtige vrouwtjes en aantal niet-drachtige vrouwtjes. De resultaten van elke paring, met inbegrip van de identiteit van elk mannetje en elk vrouwtje, moeten afzonderlijk worden gerapporteerd. Voor elk vrouwtje moet de week van de paring, het dosisniveau van het mannetje en de frequentie van levende en dode implantaten worden aangegeven.

De berekening van het totale dominante letale effect is gebaseerd op de vergelijking van de levende implantaten per vrouwtje in de testgroep met de levende implantaten per vrouwtje in de controlegroep. De verhouding tussen dode en levende implantaten bij de behandelde groep, vergeleken met dezelfde verhouding bij de controlegroep, wordt geanalyseerd om het verlies na implantatie na te gaan.

Als de gegevens van vroegtijdige en laattijdige sterften worden geregistreerd, moet dat uit de tabellen duidelijk blijken. Als het verlies vóór implantatie wordt geschat, moet dat worden gerapporteerd. Het verlies vóór implantatie kan worden berekend als een discrepantie tussen het aantal corpora lutea en het aantal implantaten of als een daling van het gemiddelde aantal implantaten per uterus in vergelijking met controleparingen.

De gegevens worden met behulp van geschikte statistische methoden geëvalueerd.

### 3. VERSLAGGEVING

#### 3.1. Verslag van de proefnemingen

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- diersoort, stam, leeftijd en gewicht van de gebruikte dieren, aantal dieren van elk geslacht in de experimentele en controlegroepen;
- teststof, (oplos)middel; geteste dosisniveaus en verantwoording voor de selectie van de dosering, negatieve en positieve controles, gegevens over de toxiciteit;
- expositiewijze en -duur;
- paringschema;
- gebruikte methode om te bepalen dat de paring heeft plaatsgevonden;
- tijdstip waarop de dieren worden gedood;
- criteria voor de beoordeling van dominante letale mutaties;
- dosis/responsverhouding (waar dat van toepassing is);
- statistische evaluatie;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

#### 3.2. Evaluatie en interpretatie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

### 4. LITERATUUR

Zie Algemene inleiding — Deel B.

---

## „B.23. TEST OP CHROMOSOOMAFWIJINGEN IN SPERMATOGONIA VAN ZOOGDIEREN

### 1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 483 van de OESO: Test op chromosoomafwijkingen in spermatogonia van zoogdieren (1997).

#### 1.1. INLEIDING

De in vivotest op chromosoomafwijkingen in spermatogonia van zoogdieren wordt gebruikt om te bepalen welke stoffen structurele chromosoomafwijkingen in spermatogonia van zoogdieren veroorzaken (1)(2)(3)(4)(5). Er zijn twee soorten structurele afwijkingen: het chromosoomtype en het chromatidetype. De meeste chemische mutagenen veroorzaken afwijkingen van het chromatidetype, maar ook het chromosoomtype komt voor. Deze methode is niet bedoeld om numerieke afwijkingen te meten en wordt meestal niet voor dat doel gebruikt. Chromosoommutaties en soortgelijke voorvallen veroorzaken veel genetische ziekten bij de mens.

Bij deze test wordt gemeten wat er met de chromosomen van bepaalde kiemcellen (spermatogonia) gebeurt en op grond van het resultaat zullen wellicht voorspellingen kunnen worden gedaan over de inductie van erfelijke mutaties in kiemcellen.

Voor deze test worden meestal knaagdieren gebruikt. Het is een in vivo cytogenetische test waarbij chromosoomafwijkingen worden gedetecteerd die zich voordoen bij mitose van spermatogonia. De methode is niet geschikt voor andere doelweefsels.

Om afwijkingen van het chromatidetype in spermatogonia te detecteren, wordt de eerste mitose na de behandeling onderzocht, voordat deze beschadigingen bij latere celdelingen verloren gaan. Aanvullende informatie van behandelde spermatogoniastamcellen kan worden verkregen door de chromosomen bij de meiose te analyseren op afwijkingen van het chromosoomtype tijdens de diakinese-metafase I, wanneer de behandelde cellen spermatocyten worden.

Deze in vivotest is bedoeld om na te gaan of mutagenen voor somatische cellen ook in kiemcellen mutageen zijn. Daarnaast is de test met spermatogonia geschikt om het gevaar van mutagene effecten te evalueren, aangezien rekening kan worden gehouden met factoren die samenhangen met het metabolisme in vivo, de farmacokinetiek en de DNA-herstelsynthese.

De testis bevat een aantal generaties spermatogonia met een uiteenlopende gevoeligheid voor chemische stoffen. De geconstateerde afwijkingen vertegenwoordigen dan ook een gecombineerde respons van de behandelde spermatogoniacelpopulaties, waarbij de in grotere aantallen voorkomende gedifferentieerde spermatogonia overheersen. Afhankelijk van hun plaats binnen de testis kunnen verschillende generaties spermatogonia vanwege de fysische en fysiologische barrière van de cellen van Sertoli en de bloed-testisbarrière al dan niet via de grote bloedsomloop bereikbaar zijn.

Als er aanwijzingen zijn dat de teststof of een reactieve metabooliet daarvan niet in het doelweefsel terechtkomt, is deze test niet geschikt.

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

#### 1.2. DEFINITIES

**Afwijking van het chromatidetype:** structurele chromosoombeschadiging waarbij breuken in individuele chromatiden ontstaan, eventueel gevolgd door recombinatie.

**Afwijking van het chromosoomtype:** structurele chromosoombeschadiging waarbij breuken in beide chromatiden op dezelfde plaats ontstaan, eventueel gevolgd door recombinatie.

**Hiaat:** een achromatische beschadiging die kleiner is dan de breedte van één chromatide en waarbij de fout in de uitlijning van de chromatiden minimaal is.

**Numerieke afwijking:** een verandering in het aantal chromosomen ten opzichte van het normale aantal dat kenmerkend is voor de gebruikte dieren.

**Polyploidie:** het voorkomen van een ander veelvoud van het haploïde aantal chromosomen ( $n$ ) dan het diploïde aantal (d.w.z.  $3n$ ,  $4n$ , enz.).

**Structurele afwijking:** een verandering in de chromosoomstructuur die bij microscopisch onderzoek tijdens de metafase van de celdeling kan worden waargenomen in de vorm van deleties, fragmenten en intra- of interchromosomale uitwisselingen.

### 1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De dieren worden langs een geschikte weg aan de teststof blootgesteld en op geschikte tijdstippen na de behandeling gedood. Voordat de dieren worden gedood, worden ze behandeld met een metafasestopper (bv. colchicine of Colcemid®). Vervolgens worden chromosoompreparaten van de kiemcellen gemaakt, die worden gekleurd; de cellen in de metafase worden geanalyseerd op chromosoomafwijkingen.

### 1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

#### 1.4.1. Voorbereiding

##### 1.4.1.1. Keuze van de diersoort

Meestal worden mannetjes van Chinese hamsters of muizen gebruikt. Ook mannetjes van andere geschikte zoogdiersoorten komen echter in aanmerking. Er dient gebruik te worden gemaakt van jonge gezonde volwassen dieren van in het laboratorium gangbare stammen. Bij het begin van de studie moet het gewichtsverschil tussen de dieren zo klein mogelijk zijn en mag dit maximaal  $\pm 20\%$  van het gemiddelde gewicht bedragen.

##### 1.4.1.2. Huisvesting en voeding

De in de algemene inleiding van deel B genoemde algemene omstandigheden worden aangehouden, maar voor de luchtvochtigheid wordt gestreefd naar 50-60%.

##### 1.4.1.3. Voorbereiding van de dieren.

Gezonde jonge volwassen mannetjes worden aselekt ingedeeld in de behandelde en controlegroepen. De kooien moeten zodanig worden geplaatst dat mogelijke effecten daarvan tot een minimum worden beperkt. De dieren krijgen een unieke identificatie. Ze krijgen minimaal vijf dagen de tijd om in het laboratorium te acclimatiseren voordat de test begint.

##### 1.4.1.4. Bereiding van de doseringen

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspenderd en eventueel vóór de toediening aan de dieren worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks worden toegevend of vóór de toediening worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen van de teststof worden gebruikt.

#### 1.4.2. Testomstandigheden

##### 1.4.2.1. Oplosmiddel/Medium

Het oplosmiddel/medium mag bij de gebruikte dosisniveaus geen toxische effecten veroorzaken en chemische reacties met de teststof moeten uitgesloten zijn. Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt.

##### 1.4.2.2. Controles

Bij elk experiment moeten tegelijkertijd positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles worden uitgevoerd. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren in de controlegroepen op identieke wijze worden behandeld als de dieren in de andere groepen.

Voor de positieve controles moet een stof worden gebruikt die in vivo structurele chromosoomafwijkingen in spermatogonia veroorzaakt bij toediening op een blootstellingsniveau waarbij een detecteerbare stijging ten opzichte van het achtergrondniveau kan worden verwacht.

De doseringen van de positieve controles moeten zodanig worden gekozen dat de effecten duidelijk zijn maar de gecodeerde objectglasjes niet onmiddellijk als zodanig herkenbaar zijn. Het is aanvaardbaar de positieve controle langs een andere weg toe te dienen dan de teststof en slechts op één tijdstip te bemonsteren. Tevens kan waar mogelijk het gebruik van stoffen uit een verwante chemische klasse als positieve controle worden overwogen. Als positieve controle kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt:

Stof	CAS-nr.	Einccs-nr.
Cyclofosfamide	50-18-0	200-015-4
Cyclofosfamide monohydraat	6055-19-2	
Cyclohexylamine	108-91-8	203-629-0
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
Acrylamide-monomeer	79-06-1	201-173-7
Triethyleenmelamine	51-18-3	200-083-5

Voor elk bemonsteringstijdstip dienen negatieve controles in het experiment te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel of het medium wordt toegediend en die verder op dezelfde manier als de andere groepen worden behandeld, tenzij uit in het verleden uitgevoerde controles aanvaardbare gegevens beschikbaar zijn over de spreiding over de dieren en de frequentie van cellen met chromosoomafwijkingen. Daarnaast moeten er ook onbehandelde controles worden gebruikt, tenzij in het verleden of in de literatuur reeds is aangetoond dat het gekozen oplosmiddel of medium geen schadelijke of mutagene effecten veroorzaakt.

## 1.5. UITVOERING

### 1.5.1. Aantal dieren

Elke behandelde en controlegroep moet minimaal vijf analyseerbare mannetjes bevatten.

### 1.5.2. Behandelingsschema

De teststof wordt bij voorkeur een of twee keer (d.w.z. als één of twee behandelingen) toegediend. De dosis kan eventueel worden gesplitst, waarbij de twee porties op dezelfde dag met een interval van niet meer dan enkele uren worden toegediend, om de toediening van een groot volume te vergemakkelijken. Voor een ander doseringsschema moet een wetenschappelijke motivering worden gegeven.

In de hoogste doseringsgroep worden twee bemonsteringstijdstippen na de behandeling gebruikt. Aangezien de kinetiek van de celcyclus door de teststof kan worden beïnvloed, wordt er één vroeg en één laat bemonsteringstijdstip gebruikt rond 24 en 48 uur na de behandeling. Voor andere doses dan de hoogste dosering moet een bemonsteringstijdstip op 24 uur of 1,5-maal de lengte van de celcyclus na de behandeling worden gekozen, tenzij bekend is dat een ander bemonsteringstijdstip geschikter is voor de detectie van effecten (6).

Daarnaast kunnen ook andere bemonsteringstijdstippen worden gebruikt. Een vroeger bemonsteringstijdstip zal bijvoorbeeld wellicht beter zijn bij stoffen die tot achterblijvende chromosomen kunnen leiden of S-onafhankelijke effecten kunnen hebben (1).

Per geval moet worden onderzocht of een schema voor herhaalde behandeling nodig is. Na herhaalde behandeling worden de dieren 24 uur (1,5-maal de lengte van de celcyclus) na de laatste behandeling gedood. Waar mogelijk kunnen aanvullende bemonsteringstijdstippen worden gebruikt.

Voordat de dieren worden gedood, worden ze intraperitoneaal geïnjecteerd met een adequate dosis metafasestopper (bv. Colcemid<sup>®</sup> of colchicine). De dieren worden na een adequate wachttijd bemonsterd. Voor muizen moet er ongeveer drie tot vijf uur worden gewacht en voor Chinese hamsters ongeveer vier tot vijf uur.



### 1.5.3. **Dosisniveaus**

Als er een oriënterend onderzoek wordt uitgevoerd omdat er geen bruikbare gegevens over de dosering beschikbaar zijn, moet dit in hetzelfde laboratorium gebeuren met dezelfde soort, dezelfde stam en hetzelfde behandelingschema als bij het hoofdonderzoek (7). Als er sprake is van toxiciteit, worden er voor het eerste bemonsteringstijdstip drie dosisniveaus gebruikt. Deze dosisniveaus moeten een interval van de maximale tot geen of vrijwel geen toxiciteit bestrijken. Op het latere bemonsteringstijdstip behoeft alleen de hoogste dosis te worden gebruikt. De hoogste dosis wordt gedefinieerd als de dosis die zodanige toxiciteitsverschijnselen veroorzaakt dat er bij hogere doses met hetzelfde doseringsschema waarschijnlijk sterfte zal optreden.

Stoffen met een specifieke biologische activiteit bij lage niet-toxische doses (zoals hormonen en mitogenen) kunnen een uitzondering vormen op deze criteria om de dosering te bepalen en moeten per geval worden beoordeeld. De hoogste dosis kan ook worden gedefinieerd als een dosis die enigerlei aanwijzing van toxiciteit voor de spermatogonia oplevert (bv. een daling van de verhouding tussen cellen in spermatogoniamitose en eerste en tweede meiosemetafase: deze daling mag niet groter zijn dan 50%).

### 1.5.4. **Limiettest**

Als een test met één dosis minimaal 2 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag, in één keer of in twee porties op dezelfde dag toegediend, geen waarneembare toxische effecten veroorzaakt en op basis van gegevens over stoffen met een verwante structuur geen genotoxiciteit te verwachten valt, zal het wellicht niet nodig zijn een volledig onderzoek met drie dosisniveaus uit te voeren. Op grond van gegevens omtrent de verwachte blootstelling van de mens kan het gebruik van een hoger dosisniveau bij de limiettest nodig worden geacht.

### 1.5.5. **Toediening van de doses**

De teststof wordt meestal met behulp van een maagsonde of een geschikte intubatiecanule of door intraperitoneale injectie toegediend. Ook andere toedieningswegen kunnen aanvaardbaar zijn, als daarvoor een motivering kan worden gegeven. Het maximale volume vloeistof dat in één keer met een sonde of injectie kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het proefdier. Het volume mag niet groter zijn dan 2 ml/100 g lichaamsgewicht. Voor het gebruik van grotere volumes moet een motivering worden gegeven. Behalve bij prikkelende of bijtende stoffen, die in hogere concentraties meestal heviger effecten veroorzaken, moeten volumeverschillen tot een minimum worden beperkt door de concentratie aan te passen, zodat op alle dosisniveaus hetzelfde volume kan worden gebruikt.

### 1.5.6. **Chromosoompreparaten**

Onmiddellijk nadat het dier is gedood worden suspensies gemaakt van cellen uit één testis of beide testes en worden deze in een hypotone oplossing gebracht en gefixeerd. De cellen worden vervolgens op objectglaasjes uitgesmeerd en gekleurd.

### 1.5.7. **Analyse**

Voor elk dier worden minimaal 100 goed gespreide metafases geanalyseerd (d.w.z. ten minste 500 metafases per groep). Wanneer een groot aantal afwijkingen wordt geconstateerd, kan dit aantal worden verlaagd. Alle objectglaasjes, ook die van de positieve en negatieve controles, worden vóór de microscopische analyse onafhankelijk gecodeerd. Aangezien bij de fixatieprocedures vaak een gedeelte van de metafasecellen breekt, waarbij chromosomen verloren gaan, moeten de gescorde cellen  $2n \pm 2$  centromeren bevatten.

## 2. **GEGEVENS**

### 2.1. **BEHANDELING VAN DE RESULTATEN**

De gegevens moeten voor elk dier in tabelvorm worden verstrekt. De eenheid bij dit experiment is het dier. Voor elk dier apart moet het aantal cellen met structurele chromosoomafwijkingen en het aantal chromosoomafwijkingen per cel worden bepaald. Er moet een overzicht worden gegeven van de verschillende soorten structurele chromosoomafwijkingen met de aantallen en de frequentie waarmee ze in de behandelde en controlegroepen voorkomen. Hiaten worden apart geregistreerd en gerapporteerd maar meestal niet in de totale frequentie van de afwijkingen opgenomen.

Als zowel mitose als meiose wordt geobserveerd, wordt als maat voor de cytotoxiciteit bij alle behandelde dieren en negatieve controles in een monster van in totaal 100 delende cellen per dier de verhouding tussen cellen in spermatogoniamitose en eerste en tweede meiosemetafase bepaald om een mogelijk cytotoxisch effect vast te stellen. Als alleen de mitose wordt geobserveerd, moet in ten minste 1 000 cellen voor elk dier de mitotische index worden bepaald.

Er zijn verschillende criteria om tot een positief resultaat te besluiten, zoals een dosisafhankelijke stijging van het relatieve aantal cellen met chromosoomafwijkingen of een duidelijke stijging van het aantal cellen met afwijkingen bij één dosis en één bemonsteringstijd. In eerste instantie moet naar de biologische relevantie van de resultaten worden gekeken. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt (8). Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn. Bij onduidelijke resultaten moet nader onderzoek worden gedaan, bij voorkeur onder gewijzigde experimentele omstandigheden.

Indien de resultaten voor een teststof niet aan bovenstaande criteria voldoen, wordt de stof bij deze test als niet-mutageen beschouwd.

Hoewel de meeste experimenten duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt herhaald, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de in-vivotest op chromosoomafwijkingen in spermatogonia wijzen erop dat de teststof in de kiemcellen van de geteste soort structurele chromosoomafwijkingen induceert. Negatieve resultaten wijzen erop dat de stof onder de testomstandigheden in de kiemcellen van de geteste soort geen chromosoomafwijkingen induceert.

De waarschijnlijkheid dat de teststof of de metabolieten daarvan in het doelweefsel terechtkomen, dient te worden besproken.

### 3. **RAPPORTAGE**

#### TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

##### Oplosmiddel/Medium

- Motivering voor de keuze van het medium.
- Oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend.

##### Proefdieren:

- Gebruikte soort/stam.
- Aantal en leeftijd van de dieren.
- Herkomst, huisvesting, voeding, enz.
- Het gewicht van elk dier aan het begin van de test, met vermelding van de spreiding, het gemiddelde en de standaardafwijking van het lichaamsgewicht voor elke groep.

##### Testomstandigheden:

- Gegevens uit het oriënterend onderzoek, indien dit is uitgevoerd.
- Achtergrond voor de keuze van de dosisniveaus.
- Achtergrond voor de keuze van de toedieningsweg.
- Gegevens over de bereiding van de teststof.
- Gegevens over de toediening van de teststof.
- Achtergrond voor de keuze van het tijdstip waarop de dieren gedood worden.

- Omrekening van de concentratie van de teststof in het voer/drinkwater (in ppm) in de dosis (in mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing.
- Gegevens over de kwaliteit van het voer en het drinkwater.
- Een gedetailleerde beschrijving van het behandelings- en bemonsteringsschema.
- Methoden voor de meting van de toxiciteit.
- Naam van de metafasestopper, gebruikt concentratie en blootstellingsduur.
- Methoden voor de bereiding van de objectglasjes.
- Criteria voor het scoren van afwijkingen.
- Aantal geanalyseerde cellen per dier.
- Criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is.

#### Resultaten:

- Teken van toxiciteit.
- Mitotische index.
- Verhouding tussen cellen in spermatogoniamitose en eerste en tweede meiosemetafase.
- Aard en aantal van de afwijkingen, afzonderlijk vermeld voor elk dier.
- Totaalaantal afwijkingen per groep.
- Aantal cellen met afwijkingen per groep.
- Indien mogelijk het verband tussen dosis en respons.
- Eventuele statistische analyses.
- Gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve controles.
- Gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve controles, met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking.
- Gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde positieve controles.
- Veranderingen in de ploïdie, indien waargenomen.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

#### 4. REFERENTIES

- (1) Adler, I.D., (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C., Lambert, B. and Magnusson, J. (eds) Liss, New York, pp. 477-484.
- (2) Adler, I.D., (1984). Cytogenetic tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.
- (3) Evans, E.P., Breckon, G. and Ford, C.E. (1964). An Air-drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, pp. 289-294.

- (4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures*. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
  - (5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, *Mutation Res.* 52, pp. 207-209.
  - (6) Adler, I.D., Shelby M.D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. *Mutation Res.*, 312, pp. 313-318.
  - (7) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.
  - (8) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clarc, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.
-

## 1. METHODE

## 1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

## 1.2. Definitie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

## 1.3. Referentiestoffen

Geen.

## 1.4. Principe van de onderzoekmethode

Het betreft een in-vivo-test bij muizen waarbij zich ontwikkelende embryo's worden blootgesteld aan chemische stoffen. De cellen in de zich ontwikkelende embryo's waarop de test is gericht, zijn melanoblasten en de genen waarop de test is gericht, zijn die welke de pigmentering van de vachtharen regelen. De zich ontwikkelende embryo's zijn heterozygoot voor een aantal van deze vachtkleurgenen. Door een mutatie in of verlies van (door een verscheidenheid van genetische gebeurtenissen) het dominant alleel van een dergelijk gen in een melanoblast komt het recessief fenotype in de cellen van de afstammelingen tot uiting, waardoor een vlek met een andere kleur wordt gevormd in de vacht van de volgende generatie muizen. Het aantal nakomelingen met deze vlekken wordt geteld en de frequentie ervan vergeleken met het aantal nakomelingen van embryo's die uitsluitend met het oplosmiddel zijn behandeld. Het wordt verondersteld dat de vlekentest somatische mutaties in foetale cellen detecteert.

## 1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

## 1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

*Vorbereidingen*

Indien mogelijk worden de teststoffen opgelost of gesuspenderd in een isotonische zoutoplossing. Niet in water oplosbare chemische stoffen worden opgelost of gesuspenderd in geschikte (oplos)middelen. Het gebruikte (oplos)middel mag niet interfereren met de teststof en geen toxische effecten veroorzaken. Er dienen verse teststofpreparaten te worden gebruikt.

*Proefdieren*

Muizen van de T-stam (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye,  $c^{hp}/c^{hp}$ ; brown b/b; dilute, short ear, d se/d se, piebald spotting, s/s) worden gepaard hetzij met de HT-stam (palled, nonagouti, brachypodie, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, 1n fz/1n fz; pearl pe/pe) of met C57 BL nonagouti, a/a). Andere mogelijke kruisingen zoals tussen NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) en DBA (nonagouti, a/a; brown b/b; dilute d/d) kunnen worden gebruikt op voorwaarde dat ze nonagouti-nakomelingen voortbrengen.

*Aantal en geslacht*

Er dient een voldoende aantal drachtige vrouwtjes te worden behandeld om voor elk gebruikt dosisniveau een geschikt aantal overlevende nakomelingen te verkrijgen. De omvang van het monster wordt bepaald door het aantal waargenomen vlekken bij de behandelde muizen en door de omvang van controlegegevens. Een negatief resultaat is alleen aanvaardbaar indien ten minste 300 nakomelingen van met de hoogste dosis behandelde vrouwtjes zijn geteld.

*Gebruik van positieve en negatieve controles*

Er dienen parallele controlegegevens van uitsluitend met het medium (negatieve controle) behandelde muizen beschikbaar te zijn. Controlegegevens uit het verleden van hetzelfde laboratorium kunnen bij elkaar worden genomen ten einde de gevoeligheid van de test te verhogen, op voorwaarde dat ze homogeen zijn. Indien geen

mutageniteit van de teststof wordt ontdekt, dienen eveneens positieve controlegegevens beschikbaar te zijn die recent in hetzelfde laboratorium zijn verkregen na behandeling met een stof waarvan bekend is dat zij mutageen is in deze test.

### Toedieningsweg

De normale toedieningsweg is orale intubatie of intraperitoneale injectie van de drachtige vrouwtjes. In voorkomend geval kan de behandeling ook via inhalatie of andere toedieningswegen geschieden.

### Dosisniveaus

Ten minste twee dosisniveaus waarvan één tekenen van toxiciteit of een kleinere nestgrootte laat zien, worden gebruikt. Voor niet-toxische stoffen dient een blootstelling aan de hoogste dosis die is toe te passen te worden gebruikt.

### Uitvoering

Normaliter wordt een enkele behandeling gegeven op dag acht, negen of tien van de dracht waarbij dag één de dag is waarop voor het eerst een vaginale plug wordt aangetroffen. Deze dagen stemmen overeen met 7,25, 8,25 en 9,25 dagen na conceptie. Tijdens deze dagen kunnen ook opeenvolgende behandelingen worden gegeven.

### Analyse

Drie à vier weken na de geboorte worden de nakomelingen gecodeerd en onderzocht op vlekken. Er dient een onderscheid te worden gemaakt tussen drie klassen van vlekken:

- a) witte vlekken op minder dan vijf mm van de mid-ventrale lijn die waarschijnlijk worden veroorzaakt door celsterfte (WMVS),
- b) gele, agouti-achtige vlekken, in de buurt van mammae, genitalia, keel, oksels en nierstreek en op het midden van het voorhoofd waarvan verondersteld wordt dat zij worden veroorzaakt door misdifferentiatie (MDS), en
- c) willekeurig op de vacht verspreide gepigmenteerde en witte vlekken waarvan verondersteld wordt dat zij worden veroorzaakt door somatische mutaties (RS).

Alle drie klassen moeten worden geteld maar alleen de laatste, RS, heeft een genetisch belang. Moeilijkheden met betrekking tot het onderscheid tussen MDS en RS kunnen worden opgelost door haarmonsters te onderzoeken met de fluorescentiemicroscopie.

Duidelijke macromorfologische afwijkingen bij de nakomelingen moeten worden vastgelegd.

## 2. GEGEVENS

De gegevens worden weergegeven als het totaal aantal getelde nakomelingen en het aantal met een of meer vermoedelijke somatische mutatievlekken. Gegevens van de behandelde en negatieve controlegroep worden met behulp van een geschikte statistische methode vergeleken. De gegevens worden ook per nest weergegeven.

## 3. VERSLAGGEVING

### 3.1. Verslag van de proefnemning

In het verslag van de proef dienen de volgende gegevens te worden vermeld:

- de voor de kruising gebruikte stam;
- aantal drachtige vrouwtjes in de experimentele en de controlegroep;
- gemiddelde nestgrootte in de experimentele en controlegroepen bij de geboorte en bij het spenen;
- dosisniveau(s) van de teststof;
- gebruikt oplosmiddel;

- dag van de dracht waarop de behandeling is gegeven;
- toedieningsweg;
- totaal aantal nakomelingen en het aantal met WMWS, MDS en RS in de experimentele en de controlegroepen;
- macromorfologische abnormaliteiten;
- dosis-responsverhouding van RS (waar dat van toepassing is);
- statistische evaluatie;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. **LITERATUUR**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

---

1. METHODE

1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. Definitie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. Referentiestoffen

Geen.

1.4. Principe van de onderzoekmethode

Met de erfelijke translocatietest bij de muis worden structurele en numerieke wijzigingen in de geslachtscelchromosomen van zoogdieren gedetecteerd wanneer zij voorkomen in het nageslacht van de eerste generatie. De soorten chromosoomwijzigingen die gedetecteerd worden, zijn reciproke translocaties en indien het vrouwelijk nageslacht wordt meegerekend, verlies van het X-chromosoom. Draggers van translocaties en XO-vrouwjes vertonen een verminderde vruchtbaarheid die wordt gebruikt voor de selectie van het F<sub>1</sub>-nageslacht met het oog op een cytogenetische analyse. Volledige steriliteit wordt veroorzaakt door bepaalde soorten translocaties (X-autosoom en c-t). Translocaties worden cytogenetisch vastgesteld in meiotische cellen in de diakinesemetafase I van mannelijke dieren, hetzij F<sub>1</sub>-mannetjes hetzij mannelijk nageslacht van F<sub>1</sub>-vrouwjes. De XO-vrouwjes zijn cytogenetisch bepaald door de aanwezigheid van slechts 39 chromosomen in beenmergmitoses.

1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

*Voorbereiding*

De teststoffen worden opgelost in een isotonische zoutoplossing. Onoplosbare stoffen worden opgelost of gesuspenderd in geschikte (oplos)middelen. Er dienen vers bereide oplossingen van de testverbinding te worden gebruikt. Indien een (oplos)middel wordt gebruikt om het toedienen te vergemakkelijken, mag deze niet interfereren met de teststof en geen toxische effecten veroorzaken.

*Toedieningsweg*

De normale toedieningswegen zijn orale intubatie of intraperitoneale injectie. Ook andere toedieningswegen kunnen geschikt zijn.

*Proefdieren*

Deze proef wordt verricht met muizen die gemakkelijk zijn te kweken en cytologisch te analyseren. Er is geen specifieke stam vereist. De gemiddelde nestgrootte bij de stam moet echter groter zijn dan acht en relatief constant. Er worden gezonde geslachtsrijpe dieren gebruikt.

*Aantal dieren*

Het vereiste aantal dieren wordt bepaald door de spontane translocatiefrequentie en het voor een positief resultaat vereiste minimale inductieniveau.

De proef wordt gewoonlijk uitgevoerd door analyse van het mannelijke F<sub>1</sub>-nageslacht. Per dosisgroep dienen ten minste 500 mannelijke F<sub>1</sub>-nakomelingen te worden onderzocht. Indien ook vrouwelijke F<sub>1</sub>-nakomelingen bij het onderzoek worden betrokken, zijn 300 mannetjes en 300 vrouwjes vereist.



## Gebruik van negatieve en positieve controles

Geschikte controlegegevens, afkomstig van parallelle en historische controles, dienen beschikbaar te zijn. Indien aanvaardbare positieve controlegegevens beschikbaar zijn van experimenten die recent in hetzelfde laboratorium zijn uitgevoerd, kunnen deze resultaten gebruikt worden in plaats van een parallelle positieve controle.

## Dosisniveau

Een dosisniveau wordt getest, gewoonlijk de hoogste dosis waarbij een minimaal toxisch effect wordt veroorzaakt zonder dat het reproductiegedrag of de overleving wordt beïnvloed. Om de dosis-responsverhouding vast te stellen, zijn nog twee lagere doses vereist. Voor niet-toxische stoffen dient blootstelling aan de hoogste dosis die is toe te passen te worden gebruikt.

## Uitvoering

### Behandeling en paring

Er zijn twee behandelingsschema's beschikbaar. Een enkele toediening van de teststof wordt het meest gebruikt. Ook kan de teststof zeven dagen per week gedurende 35 dagen worden toegediend. Het aantal paringen na de behandeling wordt bepaald door het behandelingsschema en dient voldoende groot te zijn om alle celstadia van de behandelde geslachtscellen te bemonsteren. Na de paringsperiode worden de vrouwtjes in afzonderlijke kooien ondergebracht. Bij de geboorte worden de datum, de nestgrootte en het geslacht van de nakomelingen geregistreerd. Alle mannelijke nakomelingen worden gespeend en de vrouwelijke nakomelingen worden niet gebruikt, tenzij ze worden meegenomen in de proef.

## Onderzoek naar heterozygote translocaties

Een van de volgende twee methoden wordt gebruikt:

- vruchtbaarheidsonderzoek van het  $F_1$ -nageslacht gevolgd door onderzoek van eventuele translocatiedragers door middel van een cytogenetische analyse.
- Cytogenetische analyse van alle mannelijke  $F_1$ -nakomelingen zonder voorafgaande selectie op basis van een vruchtbaarheidsonderzoek.

### a) Vruchtbaarheidsonderzoek

Verminderde vruchtbaarheid van een  $F_1$ -individu kan worden vastgesteld door observatie van de nestgrootte en/of analyse van de uterusinhoud van vrouwelijke dieren.

Er dienen criteria te worden vastgelegd voor het bepalen van normale en verminderde vruchtbaarheid van de gebruikte muizenstam.

*Observatie van de nestgrootte:* De te testen  $F_1$ -mannetjes worden in afzonderlijke kooien geplaatst met vrouwtjes van dezelfde proef of van de kolonie. De kooien worden dagelijks gecontroleerd vanaf de achttiende dag na de paring. Bij de geboorte worden de nestgrootte en het geslacht van de  $F_2$ -nakomelingen geregistreerd; hierna worden de nesten niet meer gebruikt. Indien vrouwelijke  $F_1$ -nakomelingen worden onderzocht, worden de  $F_2$ -nakomelingen uit kleine nesten voor verder onderzoek behouden. Vrouwelijke translocatiedragers worden opgespoord door cytogenetische analyse van een translocatie in een van de mannelijke nakomelingen. XO-vrouwtjes kunnen worden herkend door een verandering in de geslachtsverhouding van de nakomelingen van 1:1 naar 1:2 mannetjes/vrouwtjes. Bij een sequentiële methode worden normale  $F_1$ -dieren niet verder onderzocht indien het eerste  $F_2$ -nest een vooraf bepaalde normaalwaarde bereikt of overschrijdt; indien dit niet zo is, wordt een tweede of derde  $F_2$ -nest onderzocht.

$F_1$ -dieren die niet als normaal kunnen worden geclassificeerd na observatie van maximaal drie  $F_2$ -nesten, worden hetzij verder onderzocht door analyse van de uterusinhoud van vrouwelijke dieren hetzij rechtstreeks onderworpen aan een cytogenetische analyse.

*Analyse van de uterusinhoud:* De kleinere nestgrootte bij translocatiedragers is een gevolg van de dood van embryo's en dus wijst een hoog aantal dode implantaten op de aanwezigheid van een translocatie in het onderzochte dier. Men laat de te testen  $F_1$ -mannetjes elk met twee tot drie vrouwtjes paren. De bevruchting kan worden vastgesteld door middel van een dagelijkse controle op vaginale plugs in de morgen. Veertien tot zestien dagen later worden de vrouwtjes gedood en wordt het aantal levende en dode implantaten in de uteri geregistreerd.

### b) Cytogenetische analyse

Testespreparaten worden bereid door droging aan de lucht. Translocatiedragers worden opgespoord op grond van de aanwezigheid van multivalente configuraties tijdens de diakinesmetafase I in primaire spermatocyten. Indien ten minste twee cellen met multivalente associaties kunnen worden waargenomen, vormt dit een bewijs dat het onderzochte dier een translocatiedrager is.

Indien voor het kweken geen selectie is gemaakt, worden alle F<sub>1</sub>-mannetjes cytogenetisch onderzocht. Per mannetje dienen ten minste 25 diakinesemetafasen I microscopisch te worden onderzocht. Voor F<sub>1</sub>-mannetjes met kleine testes en meiotische afbraak vóór de diakinese of voor F<sub>1</sub>-vrouwtjes waarbij XO wordt vermoed, is een onderzoek van de mitotische metafasen, de spermatogonia of het beenmerg noodzakelijk. De aanwezigheid van een ongewoon lang en/of kort chromosoom in tien afzonderlijke cellen is een bewijs voor een bepaalde mannelijke steriele translocatie (c-t type). Sommige mannelijke steriliteit veroorzakende X-autosoomtranslocaties kunnen uitsluitend aan de hand van analyse van de bandering van de mitotische chromosomen worden vastgesteld. De aanwezigheid van 39 chromosomen in alle tien mitoses geldt als bewijs voor een XO-toestand bij een vrouwtje.

## 2. GEGEVENS

De gegevens worden in tabellarische vorm gepresenteerd.

Voor elke paringsinterval worden de gemiddelde nestgrootte en de geslachtsverhouding bij de geboorte en bij het spenen vermeld voor de paring van de ouders.

Voor vruchtbaarheidsonderzoek van F<sub>1</sub>-dieren worden de gemiddelde nestgrootten van alle normale paringen en de afzonderlijke nestgrootte voor F<sub>1</sub>-translocatiedragers gegeven. Voor de analyse van de uterusinhoud wordt het gemiddelde aantal levende en dode implantaten na normale paring en het individuele aantal levende en dode implantaten voor elke paring van F<sub>1</sub>-translocatiedragers vermeld.

Bij cytogenetische analyse van de diakinesemetafase I worden voor elke translocatiedrager het aantal soorten multivalente configuraties en het totaal aantal cellen genoteerd.

Voor steriele F<sub>1</sub>-dieren wordt het totaal aantal paringen en de duur van de paartijd vermeld. Het gewicht van de testes en gegevens van de cytogenetische analyse worden opgegeven.

Voor XO-vrouwtjes dienen de gemiddelde nestgrootte, geslachtsverhouding van F<sub>2</sub>-nakomelingen en resultaten van de cytogenetische analyse te worden vermeld.

Indien mogelijke F<sub>1</sub>-translocatiedragers vooraf geselecteerd zijn op basis van vruchtbaarheidsonderzoekingen, dienen de tabellen te vermelden hoeveel ervan bevestigde translocatieheterozygoten waren.

De gegevens van negatieve en positieve controleproeven worden op dezelfde manier voorgesteld.

## 3. VERSLAGGEVING

### 3.1. Verslag van de proefneming

In het verslag van de proef moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- gebruikte stam, leeftijd van de dieren, gewicht van behandelde dieren;
- aantal ouderdieren van elk geslacht in experimentele en controlegroepen;
- proefomstandigheden, gedetailleerde beschrijving van de behandeling, dosisniveau, oplosmiddelen, parings-schema;
- aantal en geslacht van de nakomelingen per vrouwtje, aantal en geslacht van voor translocatieanalyse gekweekte nakomelingen;
- tijdstip en criteria voor de translocatieanalyse;
- aantal en nauwkeurige beschrijving van translocatiedragers, inclusief gegevens over het kweken en de uterusinhoud (wanneer dat van toepassing is);
- cytogenetische methoden en resultaten van de microscopische analyse, bij voorkeur met foto's;
- statistische evaluatie;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

### 3.2. Evaluatie en interpretatie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

## 4. LITERATUUR

Zie Algemene inleiding — Deel B.

## B.26. SUBCHRONISCHE ORALE TOXICITEITSTEST

### TOXICITEITSONDERZOEK (ORAAL) OP KNAAGDIEREN BIJ HERHAALDE TOEDIENING (90 DAGEN)

#### 1. METHODE

De methode die voor deze subchronische orale toxiciteitstest wordt gebruikt, is een kopie van de OECD TG 408 (1998).

##### 1.1. INLEIDING

Bij de bepaling en evaluatie van de toxische eigenschappen van een chemische stof moet aan de hand van acute-toxiciteitstests of toxiciteitstests met herhaalde toediening (28 dagen) eerste informatie over de toxiciteit worden verkregen. Daarna kan de subchronische orale toxiciteit door middel van herhaalde toediening worden bepaald. Het onderzoek van 90 dagen levert informatie op over de mogelijke gevaren voor de gezondheid die kunnen voortvloeien uit herhaalde langdurige blootstelling vanaf de tijd na het spenen en de groeitijd tot aan de volgroeidheid. Het onderzoek zal informatie opleveren over de belangrijkste toxische effecten, er zullen organen die beschadigd kunnen worden en de mogelijkheid van accumulatie worden aangegeven, en er kan een inschatting worden gemaakt van een blootstellingsniveau zonder schadelijk effect, dat kan worden gebruikt bij de keuze van dosisniveaus voor chronische onderzoeken en voor de vaststelling van veiligheidscriteria voor de blootstelling van de mens.

De methode legt extra nadruk op de neurologische eindpunten en geeft een indicatie van de immunologische effecten en de effecten voor de voortplantingsorganen. Bovendien wordt benadrukt dat het van groot belang is de dieren klinisch zorgvuldig te observeren, om zoveel mogelijk informatie te verkrijgen. Met dit onderzoek moeten chemische stoffen geïdentificeerd kunnen worden die neurotoxische of immunologische effecten kunnen hebben of die schadelijk voor de voortplantingsorganen kunnen zijn, waardoor verder diepteonderzoek gerechtvaardigd kan worden.

Zie ook algemene inleiding deel B.

##### 1.2. DEFINITIES

**Dosis:** is de hoeveelheid teststof die wordt toegediend. De dosis wordt uitgedrukt in gewicht (g, mg) of in het gewicht van de teststof per gewichtseenheid proefdier (bv. mg/kg), of als constante voedingsconcentraties (ppm).

**Dosering:** is een algemene term die de dosis alsook de frequentie daarvan en de doseringsperiode omvat.

**NOAEL:** is de afkorting voor het niveau zonder waarneembaar schadelijk effect en is de hoogste dosis waarbij nog geen waarneembare toxiciteitsverschijnselen optreden.

##### 1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof wordt gedurende een periode van 90 dagen dagelijks oraal toegediend aan verscheidene groepen proefdieren, in geleidelijk stijgende doses. Er wordt één dosis per groep gebruikt. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks geobserveerd om tekenen van toxiciteit te ontdekken. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het eind van het onderzoek leven, wordt necropsie verricht.

##### 1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

###### 1.4.1. Voorbereiding van de dieren

Voor het onderzoek worden gezonde dieren gebruikt die ten minste vijf dagen onder gelijke huisvestings- en voedingsomstandigheden zijn gehouden als tijdens de test en die niet eerder voor experimenten zijn gebruikt. De proefdieren worden op basis van kenmerken als soort, stam, oorsprong, geslacht, gewicht en/of leeftijd ingedeeld. De dieren worden willekeurig in de controle- en behandelingsgroepen ingedeeld. De kooien worden zodanig neergezet dat mogelijke effecten door de plaatsing daarvan tot een minimum worden beperkt. Elk dier krijgt een uniek identificatienummer.

#### 1.4.2. Voorbereiding van de doses

De teststof kan via een maagsonde, met de voeding of met het drinkwater worden toegediend. De wijze van de orale toediening hangt af van het doel van het onderzoek en van de fysisch-chemische eigenschappen van het testmateriaal.

Waar nodig wordt de teststof in een geschikt medium opgelost of gesuspenderd. Het verdient aanbeveling om in eerste instantie een oplossing/suspensie in water te overwegen. Als dit niet mogelijk is, kan een oplossing/emulsie in achtereenvolgens plantaardige olie (bv. maïsolie) of een ander medium worden overwogen. Van niet-waterige media moeten de toxische eigenschappen bekend zijn. De stabiliteit van de teststof tijdens de toediening moet worden vastgesteld.

#### 1.4.3. Proefomstandigheden

##### 1.4.3.1. Proefdieren

De voorkeur wordt gegeven aan ratten, maar er kunnen ook andere soorten knaagdieren worden gebruikt, bijvoorbeeld muizen. De proef dient te worden uitgevoerd met stammen van gezonde, jonge volgroeide dieren die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt. De wijfjes moeten nullipaar zijn en niet zwanger. De toediening moet zo snel mogelijk na het spenen beginnen maar in ieder geval voordat de dieren negen weken oud zijn. Per geslacht mag bij het begin van het onderzoek het gewicht van de dieren die worden gebruikt, niet meer dan  $\pm 20\%$  van het gemiddelde gewicht afwijken. Indien het onderzoek wordt uitgevoerd als voorstudie van een langdurig chronische-toxiciteitsonderzoek, moeten dieren van dezelfde stam en oorsprong voor beide onderzoeken worden gebruikt.

##### 1.4.3.2. Aantal en geslacht

Voor ieder dosisniveau moeten ten minste 20 dieren (tien wijfjes en tien mannetjes) worden gebruikt. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal dieren worden verhoogd met het aantal dat tussentijds zal worden gedood. Op basis van de aanwezige kennis van de chemische stof of een stof die daar veel op lijkt, verdient het overweging een extra satellietgroep van tien dieren (vijf per geslacht) op te nemen in de controlegroep en in de groep met het hoogste dosisniveau, om na de behandeling te kunnen nagaan of er sprake is van reversibiliteit of persistentie van eventuele toxische effecten. De duur van deze nabehandelingsperiode moet worden vastgesteld in overeenstemming met de waargenomen effecten.

##### 1.4.3.3. Dosisniveaus

Ten minste drie dosisniveaus en een bijbehorende controle zijn vereist, tenzij een limiettest wordt uitgevoerd (zie 1.4.3.4). De dosisniveaus kunnen gebaseerd zijn op de resultaten van onderzoeken met herhaalde toediening of van verkennende onderzoeken, en er moet rekening worden gehouden met bestaande toxicologische en toxicokinetische gegevens die voor de teststof of aanverwante materialen beschikbaar zijn. Indien er geen beperkingen vanwege de fysisch-chemische aard of de biologische effecten van de teststof zijn, moet het hoogste dosisniveau worden gekozen om toxiciteit te veroorzaken, maar niet de dood of ernstige pijn. Er moet een afnemende reeks dosisniveaus worden gekozen om elke doseringsgerelateerde respons en een niveau zonder schadelijk effect (NOAEL) op het laagste dosisniveau aan te tonen. Doorgaans zijn twee- tot viervoudige intervallen optimaal voor de instelling van de afnemende dosisniveaus, en de toevoeging van een vierde testgroep is vaak te verkiezen boven het gebruik van zeer grote intervallen (bv. meer dan een factor van 6 à 10) tussen twee doseringen.

De controlegroep moet een onbehandelde groep of een mediumcontrolegroep zijn, voorzover een medium wordt gebruikt voor de toediening van de teststof. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren in de controlegroep op dezelfde wijze worden behandeld als die in de testgroep. Indien een medium wordt gebruikt, moet het medium aan de controlegroep in het voor de proef maximaal gebruikte volume worden toegediend. Indien een teststof wordt toegediend via de voeding en een geringere voedingsopname veroorzaakt, kan een paargevoede controlegroep nuttig zijn om onderscheid te maken tussen een vermindering vanwege de eetbaarheid of vanwege toxicologische veranderingen in het testmodel.

Er moet rekening worden gehouden met de navolgende eigenschappen van het medium en andere additieven, naargelang hetgeen van toepassing is: effecten op de absorptie, distributie, metabolisme of retentie van de teststof; effecten op de chemische eigenschappen van de teststof die de toxische karakteristieken daarvan kunnen veranderen; en effecten op het voedsel- of waterverbruik of de voedingsstatus van de dieren.

##### 1.4.3.4. Limiettest

Indien een test bij een dosisniveau van ten minste 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag en met gebruikmaking van de procedures die voor deze studie worden beschreven, een niveau zonder schadelijk effect oplevert en indien toxiciteit op grond van informatie over qua samenstelling aanverwante stoffen niet te verwachten is, hoeft wellicht niet het uitvoeren van een volledig onderzoek met gebruikmaking van drie doseringsniveaus overwogen te worden. De limiettest moet worden uitgevoerd tenzij het blootstellingsniveau van de mens duidt op de noodzaak een hoger dosisniveau te gebruiken.

### 1.5.1. Toediening van de doses

De dieren krijgen gedurende een periode van 90 dagen, 7 dagen per week, een dosis van de teststof toegediend. Voor elk ander doseringsinterval, bv. vijf dagen per week, moet een goede reden zijn. Indien de teststof via een maagsonde aan het dier wordt toegediend, moet dit in één enkele dosis gebeuren met gebruikmaking van een maagbuisje of een geschikte intubaticanule. De maximale hoeveelheid vloeistof die in één keer kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het proefdier. Het maximale volume dat voor de proef wordt gebruikt, mag niet groter zijn dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht, behalve bij oplossingen in water, waarvan het volume maximaal 2 ml/100 g lichaamsgewicht mag bedragen. Afgezien van irriterende of bijtende stoffen die normaliter bij hogere concentraties ergere effecten vertonen, moet de variabiliteit in het voor de proef gebruikte volume zo klein mogelijk worden gehouden door de concentratie zodanig aan te passen dat bij alle dosisniveaus een constant volume wordt gewaarborgd.

Wanneer stoffen met de voeding of het drinkwater worden toegediend, moet erop worden toegezien dat de hoeveelheden van de teststof niet interfereren met de normale voedings- of waterbalans. Indien de teststof met de voeding wordt toegediend, kan een constante voedingsconcentratie (ppm) of een constant dosisniveau als functie van het lichaamsgewicht van de dieren worden gebruikt; de gekozen methode moet worden gespecificeerd. Indien de stof via een maagsonde wordt toegediend, moeten de doses dagelijks op vaste tijdstippen worden gegeven. De doses moeten geregeld worden aangepast om een constant dosisniveau als functie van het lichaamsgewicht van het dier te verkrijgen. Indien een onderzoek gedurende een periode van 90 dagen wordt gebruikt als voorstudie van een langdurig chronisch toxiciteitsonderzoek, moet in beide onderzoeken dezelfde voeding worden gebruikt.

### 1.5.2. Waarnemingen

De observatieperiode moet ten minste 90 dagen duren. Dieren in satellietgroepen voor latere waarnemingen moeten nog gedurende een gepaste periode zonder behandeling worden gehouden om herstel of voortduren van de toxische effecten te kunnen vaststellen.

De proefdieren moeten ten minste eenmaal per dag worden geobserveerd, bij voorkeur op hetzelfde tijdstip, waarbij rekening moet worden gehouden met de piekperiode van verwachte effecten na de toediening van de dosis. De klinische conditie van de dieren moet geregistreerd worden. Ten minste tweemaal per dag, normaliter aan het begin en eind van elke dag, moeten alle dieren worden onderzocht op tekenen van ziekelijkheid of sterfte.

Ten minste eenmaal vóór de eerste blootstelling (om vergelijkingen op hetzelfde gebied te kunnen trekken) en eenmalig een week daarna moeten alle dieren aan een uitgebreid klinisch onderzoek worden onderworpen. De dieren moeten buiten hun kooi worden geobserveerd, bij voorkeur telkens in een standaardgebied en op hetzelfde tijdstip. De gegevens moeten zorgvuldig geregistreerd worden, bij voorkeur met behulp van scoringsystemen die door het proeflaboratorium expliciet zijn gedefinieerd. Er moet getracht worden verschillen in de observatiecondities tot een minimum te beperken. Er dient onder meer te worden gelet op veranderingen van huid en vacht, ogen en slijmvliezen, het voorkomen van secreties en excreties, en autonome activiteiten (bv. tranenvloed, pilo-erectie, pupilgrootte, abnormaal ademhalingspatroon). Ook veranderingen in de manier van lopen, de houding en de reactie op de behandeling alsmede de aanwezigheid van klonische of tonische bewegingen, stereotypen (bv. abnormaal poetsgedrag, blijven ronddraaien) of bizar gedrag (bv. zelfverminking, achteruit lopen) moeten geregistreerd worden (1).

Vóór de toediening van de teststof en na beëindiging van het onderzoek wordt een oftalmologisch onderzoek uitgevoerd, waarbij gebruik wordt gemaakt van een oftalmoscoop of een even geschikt apparaat. Dit onderzoek wordt bij voorkeur op alle dieren verricht, maar ten minste op die in de groepen met het hoge dosisniveau en in de controlegroepen. Wanneer oogafwijkingen worden vastgesteld, moeten alle dieren worden onderzocht.

Tegen het einde van de blootstellingsperiode maar in geen geval vóór de elfde week moeten onderzoeken naar de sensorische reacties op verschillende soorten stimuli (1) (bv. auditieve, visuele en proprioceptieve stimuli) (2), (3), (4), alsmede een bepaling van de grijpkracht (5) en van de motorische activiteit (6) worden verricht. Meer informatie over de procedures die kunnen worden gevolgd, is te vinden in de desbetreffende literatuur. Er kunnen evenwel ook andere dan de genoemde procedures worden toegepast.

De uitvoering van functionele waarnemingen tegen het eind van het onderzoek kan achterwege worden gelaten indien andere onderzoeken al gegevens over functionele waarnemingen hebben opgeleverd en uit de dagelijkse klinische waarnemingen geen functionele gebreken zijn gebleken.

In uitzonderingsgevallen kunnen functionele waarnemingen ook achterwege worden gelaten bij groepen die anders tekenen van toxiciteit vertonen in een mate die aanzienlijk zou interfereren met de uitvoering van de functionele test.

### 1.5.2.1. Lichaamsgewicht en voedsel-/waterverbruik

Alle dieren moeten ten minste eenmaal per week worden gewogen. Ook het voedselverbruik moet ten minste wekelijks worden gemeten. Indien de teststof met het drinkwater wordt toegediend, moet ook het waterverbruik ten minste wekelijks worden gemeten. Het meten van het waterverbruik kan ook worden overwogen bij voedsel- of maagsonderzoeken, gedurende welke de drinkactiviteit kan veranderen.

### 1.5.2.2. Hematologie en klinisch-biochemische bepalingen

Van een bepaalde plek moeten bloedmonsters worden genomen die, voorzover van toepassing, onder gepaste omstandigheden bewaard moeten worden. Aan het einde van de testperiode moeten de monsters worden genomen vlak vóór het doden van de dieren of als onderdeel van de dodingsprocedure.

Aan het einde van de testperiode en indien tussentijds bloedmonsters zijn genomen, moeten de volgende hematologische onderzoeken worden verricht: bepaling van het hematocriet en het hemoglobinegehalte, erythrocytentelling, totale en gedifferentieerde telling van de leukocyten, telling van de bloedplaatjes en meting van een maat voor het stollingsvermogen.

Klinisch-biochemische bepalingen die bedoeld zijn om wezenlijke toxische effecten in weefsels en met name effecten op de nier en lever te onderzoeken, moeten worden verricht op de bloedmonsters die van elk dier zijn genomen vlak vóór het doden daarvan of als onderdeel van de dodingsprocedure (afgezien van stervende en/of tussentijds gedode dieren). Op dezelfde wijze als bij de hematologische onderzoeken kunnen tussentijds bloedmonsters worden genomen ten behoeve van klinisch-biochemische tests. Het is aan te bevelen in de nacht voordat de bloedmonsters worden genomen de dieren voedsel te onthouden<sup>(1)</sup>. Bepalingen in plasma of serum moeten het volgende omvatten: natrium, kalium, glucose, totaal cholesterol, ureum, bloedureum, stikstof, creatinine, totaal eiwit en albumine, en meer dan twee enzymen die symptomatisch zijn voor hepatocellulaire effecten (zoals alanineaminotransferase, aspartaataminotransferase, alkalinefosfatase, gammaglutamyltranspeptidase en sorbitoldehydrogenase). Er kunnen ook metingen worden verricht van extra enzymen (van hepatische of andere oorsprong) en galzuren, die onder bepaalde omstandigheden nuttige informatie kunnen opleveren.

Als optie kunnen tijdens de laatste week van het onderzoek de volgende urineonderzoeken worden verricht, waarbij op regelmatige tijdstippen urinemonsters moeten worden genomen: uitzien, volume, osmolaliteit of relatieve dichtheid, pH, eiwit, glucose en bloed/bloedcellen.

Bovendien moet worden overwogen serummarkers van algemene weefselbeschadiging te onderzoeken. Andere bepalingen die uitgevoerd moeten worden wanneer de bekende eigenschappen van de teststof invloed hebben of kunnen hebben op de bijbehorende metabolische profielen: calcium, fosfor, triglyceriden bij nuchtere toestand, bepaalde hormonen, methemoglobine en cholinesterase-activiteit. Deze moeten voor chemische stoffen in bepaalde klassen of per geval geïdentificeerd worden.

Algemeen is een flexibele aanpak nodig, afhankelijk van de diersoorten en het waargenomen en/of verwachte effect van een bepaalde stof.

Wanneer historische basisgegevens ontoereikend zijn, moet worden overwogen of het noodzakelijk is vóór aanvang van de toediening hematologische en klinisch-biochemische variabelen te bepalen; het is algemeen niet aan te bevelen deze gegevens vóór de behandeling te genereren (7).

### 1.5.2.3. Macroscopische necropsie

Bij alle dieren in de studie moet een volledige macroscopische necropsie worden uitgevoerd, waaronder een zorgvuldig onderzoek van het huidoppervlak, alle lichaamsopeningen alsmede de schedelholte, de borstholte en de buikholte, en de inhoud daarvan. Lever, nieren, bijnieren, testes, epididymides, uterus, ovaria, thymus, milt, hersenen en het hart van alle dieren (afgezien van stervende en/of tussentijds gedode dieren) moeten zo nodig ontdaan worden van aanhechtend weefsel, en ze moeten zo spoedig mogelijk na de sectie nat worden gewogen om te voorkomen dat ze uitdrogen.

(1) Voor een aantal metingen serum en plasma, met name voor glucose, is het aan te bevelen de nacht ervoor de dieren voedsel te onthouden. De belangrijkste reden hiervoor is dat de verhoogde variabiliteit die onvermijdelijk voortvloeit uit het nuttigen van voedsel, ertoe zou leiden dat subtielere effecten verborgen en de interpretatie moeilijker zou worden. Aan de andere kant kan het 's nachts onthouden van voedsel echter interfereren met het algemere metabolisme van de dieren en, met name in voedingsonderzoeken, de dagelijkse blootstelling aan de teststof verstoren. Indien ervoor wordt gekozen 's nachts voedsel te onthouden, moeten de klinisch-biochemische bepalingen worden uitgevoerd na de functionele waarnemingen van het onderzoek.

De volgende weefsels moeten in een medium worden bewaard dat zowel voor het type weefsel als voor het beoogde latere histopathologische onderzoek geschikt is: elk macroscopisch waarneembaar letsel, hersenen (alle relevante delen, waaronder cerebrum, cerebellum en merg/brug), ruggenmerg (op drie niveaus: cervicaal, middenthoracaal en lumbaal), hypofyse, schildklier, bijschildklier, thymus, slokdarm, speekselklieren, maag, dunne en dikke darmen (met inbegrip van de eilandjes van Peyer), lever, alvleesklier, nieren, bijnieren, milt, hart, luchtpijp en longen (behandeling door opblazen met een fixatief en vervolgens onderdompelen), aorta, geslachtsklieren, uterus, bijbehorende geslachtsorganen, borstklieren van wijfjes, prostaat, urineblaas, galblaas (muisen), lymfklieren (bij voorkeur één lymfklier op de toedieningsroute en één op een afstand van de toedieningsroute om systemische effecten op te vangen), perifere zenuw (grote beenzenuw of scheenbeen) bij voorkeur zeer dicht bij de spier, een beenmergsectie (en/of een vers beenmergaspiraats), huid en ogen (indien tijdens de oftalmologische onderzoeken veranderingen werden waargenomen). Uit de klinische en andere bevindingen kan de noodzaak blijken verder weefsel te onderzoeken. Ook organen waarvan op basis van de bekende eigenschappen van de teststof verondersteld wordt dat ze beschadigd kunnen worden, moeten worden bewaard.

#### 1.5.2.4. Histopathologisch onderzoek

Bij alle dieren in de groep behandeld met het hoogste dosisniveau en bij de dieren in de controlegroep moet een volledig histopathologisch onderzoek worden verricht op de bewaarde organen en weefsels. Organen en weefsels die blijken te zijn beschadigd door de teststof op het hoogste dosisniveau, moeten in alle groepen met een lagere dosering worden onderzocht.

Alle macroscopisch waarneembare beschadigingen moeten onderzocht worden.

Bij het histopathologisch onderzoek van de dieren in de satellietgroepen moet speciaal worden gelet op die organen en weefsels waarin effecten blijken te zijn opgetreden bij de andere behandelde groepen.

## 2. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

### 2.1. GEGEVENS

Er moeten individuele gegevens voor iedere testgroep worden verstrekt. Bovendien moeten alle gegevens worden samengevat in tabellen die voor iedere testgroep laten zien: het aantal dieren aan het begin van het onderzoek, het aantal dieren dat tijdens de test is gestorven of humaan moest worden gedood en het tijdstip waarop de dood bij de individuele dieren is ingetreden, het aantal dieren dat toxiciteitsverschijnselen vertoont, een beschrijving van de waargenomen toxische effecten, met inbegrip van het verloop in de tijd, de duur en de ernst van eventuele toxische effecten, het aantal dieren dat beschadigingen vertoont, de aard van de beschadigingen en het percentage dieren dat elk type beschadiging vertoont.

Voorzover van toepassing moeten alle waargenomen resultaten met behulp van een geschikte en algemeen erkende statistische methode worden geëvalueerd. De statistische methoden en de te analyseren gegevens moeten tijdens het ontwerp van het onderzoek worden gekozen.

### 2.2. VERSLAG VAN HET ONDERZOEK

In het verslag moeten de volgende gegevens worden opgenomen:

#### 2.2.1. Teststof:

- fysieke aard, zuiverheid en fysico-chemische eigenschappen.
- identificatiegegevens.
- medium (waar van toepassing): rechtvaardiging van het gekozen medium wanneer dat geen water is.

#### 2.2.2. Diersoort:

- gebruikte diersoort en stam.
- aantal, leeftijd en geslacht van de dieren.

- herkomst, leefomstandigheden, voeding enz.,
- gewicht van elk dier aan het begin van de proef.

### 2.2.3. **Proefomstandigheden:**

- redenen voor de keuze van het dosisniveau.
- details over de samenstelling van de teststof en voedselbereiding, gerealiseerde concentratie, stabiliteit en homogeniteit van het preparaat,
- details over de toediening van de teststof.
- toegepaste, werkelijke doses (mg/kg lichaamsgewicht/dag) en conversiefactor van de teststofconcentratie (ppm) in het voedsel/drinkwater naar de werkelijke dosis, voorzover van toepassing,
- details over de kwaliteit van het voedsel en drinkwater.

### 2.2.4. **Resultaten:**

- lichaamsgewicht en veranderingen in het lichaamsgewicht,
- waar van toepassing voedselverbruik en waterverbruik,
- gegevens over de toxische reacties naar geslacht en dosis, inclusief toxiciteitsverschijnselen,
- aard, ernst en duur van de klinische waarnemingen (al dan niet reversibel),
- uitgevoerd oftalmologisch onderzoek,
- bepalingen van de activiteit van de zintuigen, de grijpkracht en de motorische activiteit (indien beschikbaar),
- uitgevoerde hematologische onderzoeken en alle resultaten,
- uitgevoerde klinisch-biochemische onderzoeken en alle resultaten,
- lichaamsgewicht, orgaangewichten en verhoudingen lichaams-/orgaangewicht van gestorven dieren,
- bevindingen bij de necropsie,
- een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen,
- indien beschikbaar absorptiegegevens,
- waar van toepassing statistische behandeling van de resultaten.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

## 3. **REFERENTIES**

- (1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.
- (2) Tupper, D. E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, pp. 999-1003.
- (3) Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health*, 9, pp. 691-704.
- (4) Moser, V. C., Mc Daniel, K. M., Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, pp. 267-283.



- (5) Meyer O. A., Tilson H. A., Byrd W. C., Riley M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, pp. 233-236.
  - (6) Crofton K. M., Howard J. L., Moser V. C., Gill M. W., Reiter L. W., Tilson H. A., MacPhail R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13, pp. 599-609.
  - (7) Weingand K., Brown G., Hall R. et al. (1996). 'Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies', *Fundam. & Appl. Toxicol.*, 29, pp. 198-201.
-

## B.27. SUBCHRONISCHE ORALE TOXICITEITSTEST

### TOXICITEITSONDERZOEK (ORAAAL) OP DIEREN ANDERS DAN KNAAGDIEREN BIJ HERHAALDE TOEDIENING (90 DAGEN)

#### 1. METHODE

De methode die voor deze subchronische orale toxiciteitstest wordt gebruikt, is een kopie van de OECD TG 409 (1998).

#### 1.1. INLEIDING

Bij de bepaling en evaluatie van de toxische eigenschappen van een chemische stof moet aan de hand van acute-toxiciteitstests of toxiciteitstests met herhaalde toediening (28 dagen) eerste informatie over de toxiciteit worden verkregen. Daarna kan de subchronische orale toxiciteit door middel van herhaalde toediening worden bepaald. Het onderzoek van 90 dagen levert informatie op over de mogelijke gevaren voor de gezondheid die kunnen voortvloeien uit herhaalde blootstelling gedurende een periode van snelle groei tot aan de jonge volgroeiheid. Het onderzoek zal informatie opleveren over de belangrijkste toxische effecten, er zullen organen die beschadigd kunnen worden en de mogelijkheid van accumulatie worden aangegeven, en er kan een inschatting worden gemaakt van een blootstellingsniveau zonder schadelijk effect, dat kan worden gebruikt bij de keuze van dosisniveaus voor chronische onderzoeken en voor de vaststelling van veiligheidscriteria voor de blootstelling van de mens.

Met de testmethode kunnen negatieve effecten van blootstelling aan een chemische stof bij diersoorten anders dan knaagdieren worden geïdentificeerd. De test wordt uitsluitend gebruikt:

- indien uit effecten die in andere studies zijn vastgesteld, blijkt dat er behoefte is aan verduidelijking/karakterisering in een tweede diersoort anders dan knaagdieren;
- indien uit toxicokinetische studies blijkt dat het gebruik van een specifieke diersoort anders dan knaagdieren de beste keuze als proefdier is, of
- indien andere specifieke redenen het gebruik van diersoorten anders dan knaagdieren rechtvaardigen.

Zie ook algemene inleiding deel B.

#### 1.2. DEFINITIES

**Dosis:** is de hoeveelheid teststof die wordt toegediend. De dosis wordt uitgedrukt in gewicht (g, mg) of in het gewicht van de teststof per gewichtseenheid proefdier (bv. mg/kg), of als constante voedingsconcentraties (ppm).

**Dosering:** is een algemene term die de dosis alsook de frequentie daarvan en de doseringsperiode omvat.

**NOAEL:** is de afkorting voor het niveau zonder waarneembaar schadelijk effect en is de hoogste dosis waarbij nog geen waarneembare toxiciteitsverschijnselen optreden.

#### 1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof wordt gedurende een periode van 90 dagen dagelijks oraal toegediend aan verscheidene groepen proefdieren, in geleidelijk stijgende doses. Er wordt één dosis per groep gebruikt. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks geobserveerd om tekenen van toxiciteit te ontdekken. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het eind van het onderzoek leven, wordt necropsie verricht.

#### 1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

##### 1.4.1. Keuze van de diersoort

De meest gebruikte diersoort anders dan knaagdieren is de hond, die van een bepaald ras moet zijn; de beagle wordt in dit verband vaak gebruikt. Ook andere diersoorten, bv. zwijnen en minivarkens, kunnen gebruikt worden. Primaten zijn niet aan te bevelen en voor het gebruik daarvan moeten goede redenen zijn. Er moeten jonge, gezonde dieren worden gebruikt. In het geval van honden moet met de toediening van de

dosis bij voorkeur worden begonnen als de honden 4-6 maanden maar in geen geval meer dan 9 maanden oud zijn. Indien het onderzoek wordt uitgevoerd als voorstudie van een langdurig chronisch toxiciteitsonderzoek, moeten dieren van dezelfde soort/ras voor beide onderzoeken worden gebruikt.

#### 1.4.2. **Vorbereiding van de dieren**

Voor het onderzoek worden gezonde, jonge dieren gebruikt die onder gelijke huisvestings- en voedingsomstandigheden zijn gehouden als tijdens de test en die niet eerder voor experimenten zijn gebruikt. De duur van de acclimatisering hangt af van de gekozen diersoort en de oorsprong daarvan. In dit verband gelden de volgende aanbevelingen: ten minste vijf dagen voor honden of voor dit doel speciaal gefokte varkens uit een eigen kolonie en ten minste twee weken als deze dieren van externe oorsprong zijn. De proefdieren worden op basis van kenmerken als soort, stam, oorsprong, geslacht, gewicht en/of leeftijd ingedeeld. De dieren worden willekeurig in de controle- en behandelingsgroepen ingedeeld. De kooien worden zodanig neergezet dat mogelijke effecten door de plaatsing daarvan tot een minimum worden beperkt. Elk dier krijgt een uniek identificatienummer.

#### 1.4.3. **Vorbereiding van de doses**

De teststof kan met de voeding, met het drinkwater, via een maagsonde of in capsules worden toegediend. De wijze van de orale toediening hangt af van het doel van het onderzoek en van de fysisch-chemische eigenschappen van het testmateriaal.

Waar nodig wordt de teststof in een geschikt medium opgelost of gesuspenderd. Het verdient aanbeveling om in eerste instantie een oplossing/suspensie in water te overwegen. Als dit niet mogelijk is, kan een oplossing/emulsie in achtereenvolgens plantaardige olie (bv. maïsolie) of een ander medium worden overwogen. Van niet-waterige media moeten de toxische eigenschappen bekend zijn. De stabiliteit van de teststof tijdens de toediening moet worden vastgesteld.

### 1.5. **PROCEDURE**

#### 1.5.1. **Aantal en geslacht van de dieren**

Voor ieder dosisniveau moeten ten minste acht dieren (vier wijfjes en vier mannetjes) worden gebruikt. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal dieren worden verhoogd met het aantal dat tussentijds zal worden gedood. Aan het einde van het onderzoek moeten voldoende dieren overblijven om een zinvolle evaluatie van de toxische effecten mogelijk te maken. Op basis van de aanwezige kennis van de chemische stof of een stof die daar veel op lijkt, verdient het overwegen een extra satellietgroep van acht dieren (vier per geslacht) op te nemen in de controlegroep en in de groep met het hoogste dosisniveau, om na de behandeling te kunnen nagaan of er sprake is van reversibiliteit of persistentie van eventuele toxische effecten. De duur van deze nabehandelperiode moet worden vastgesteld in overeenstemming met de waargenomen effecten.

#### 1.5.2. **Dosisniveaus**

Ten minste drie dosisniveaus en een bijbehorende controle zijn vereist, tenzij een limiettest wordt uitgevoerd (zie 1.5.3). De dosisniveaus kunnen gebaseerd zijn op de resultaten van onderzoeken met herhaalde toediening of van verkennende onderzoeken, en er moet rekening worden gehouden met bestaande toxicologische en toxicokinetische gegevens die voor de teststof of aanverwante materialen beschikbaar zijn. Indien er geen beperkingen vanwege de fysisch-chemische aard of de biologische effecten van de teststof zijn, moet het hoogste dosisniveau worden gekozen om toxiciteit te veroorzaken, maar niet de dood of ernstige pijn. Er moet een afnemende reeks dosisniveaus worden gekozen om elke doseringsgerelateerde respons en een niveau zonder schadelijk effect (NOAEL) op het laagste dosisniveau aan te tonen. Doorgaans zijn twee- tot viervoudige intervallen optimaal voor de instelling van de afnemende dosisniveaus, en de toevoeging van een vierde testgroep is vaak te verkiezen boven het gebruik van zeer grote intervallen (bv. meer dan een factor van 6 à 10) tussen twee doseringen.

De controlegroep moet een onbehandelde groep of een mediumcontrolegroep zijn, voorzover een medium wordt gebruikt voor de toediening van de teststof. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren in de controlegroep op dezelfde wijze worden behandeld als die in de testgroep. Indien een medium wordt gebruikt, moet het medium aan de controlegroep in het voor de proef maximaal gebruikte volume worden toegediend. Indien een teststof wordt toegediend via de voeding en een geringere voedingsopname veroorzaakt, kan een paar gevoede controlegroep nuttig zijn om onderscheid te maken tussen een vermindering vanwege de eetbaarheid of vanwege toxicologische veranderingen in het testmodel.

Er moet rekening worden gehouden met de navolgende eigenschappen van het medium en andere additieven, naargelang hetgeen van toepassing is: effecten op de absorptie, distributie, metabolisme of retentie van de teststof; effecten op de chemische eigenschappen van de teststof die de toxische karakteristieken daarvan kunnen veranderen; en effecten op het voedsel- of waterverbruik of de voedingsstatus van de dieren.

### 1.5.3. **Limiettest**

Indien een test bij een dosisniveau van ten minste 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag en met gebruikmaking van de procedures die voor deze studie worden beschreven, een niveau zonder schadelijk effect oplevert en indien toxiciteit op grond van informatie over qua samenstelling aanverwante stoffen niet te verwachten is, hoeft wellicht niet het uitvoeren van een volledig onderzoek met gebruikmaking van drie doseringsniveaus overwogen te worden. De limiettest moet worden uitgevoerd zolang het blootstellingsniveau van de mens duidt op de noodzaak een hoger dosisniveau te gebruiken.

### 1.5.4. **Toediening van de doses**

De dieren krijgen gedurende een periode van 90 dagen, zeven dagen per week, een dosis van de teststof toegediend. Voor elk ander doseringsinterval, bv. vijf dagen per week, moet een goede reden zijn. Indien de teststof via een maagsonde aan het dier wordt toegediend, moet dit in één enkele dosis gebeuren met gebruikmaking van een maagbuisje of een geschikte intubatiecannule. De maximale hoeveelheid vloeistof die in één keer kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het proefdier. Normaliter moet het volume zo laag mogelijk worden gehouden. Afgezien van irriterende of bijtende stoffen die normaliter bij hogere concentraties ergere effecten vertonen, moet de variabiliteit in het voor de proef gebruikte volume zo klein mogelijk worden gehouden door de concentratie zodanig aan te passen dat bij alle dosisniveaus een constant volume wordt gewaarborgd.

Wanneer stoffen met de voeding of het drinkwater worden toegediend, moet erop worden toegezien dat de hoeveelheden van de teststof niet interfereren met de normale voedings- of waterbalans. Indien de teststof met de voeding wordt toegediend, kan een constante voedingsconcentratie (ppm) of een constant dosisniveau als functie van het lichaamsgewicht van de dieren worden gebruikt; de gekozen methode moet worden gespecificeerd. Indien de stof via een maagsonde wordt toegediend, moeten de doses dagelijks op vaste tijdstippen worden gegeven. De doses moeten geregeld worden aangepast om een constant dosisniveau als functie van het lichaamsgewicht van het dier te verkrijgen. Indien een onderzoek gedurende een periode van 90 dagen wordt gebruikt als voorstudie van een langdurig chronisch toxiciteitsonderzoek, moet in beide onderzoeken dezelfde voeding worden gebruikt.

### 1.5.5. **Waarnemingen**

De observatieperiode moet ten minste 90 dagen duren. Dieren in satellietgroepen voor latere waarnemingen moeten nog gedurende een gepaste periode zonder behandeling worden gehouden om herstel of voortduren van de toxische effecten te kunnen vaststellen.

De proefdieren moeten ten minste eenmaal per dag worden geobserveerd, bij voorkeur op hetzelfde tijdstip, waarbij rekening moet worden gehouden met de piekperiode van verwachte effecten na de toediening van de dosis. De klinische conditie van de dieren moet geregistreerd worden. Ten minste tweemaal per dag, normaliter aan het begin en eind van elke dag, moeten alle dieren worden onderzocht op tekenen van ziekelijkheid of sterfte.

Ten minste eenmaal vóór de eerste blootstelling (om vergelijkingen op hetzelfde gebied te kunnen trekken) en eenmalig een week daarna moeten alle dieren aan een uitgebreid klinisch onderzoek worden onderworpen. De dieren moeten buiten hun kooi worden geobserveerd, bij voorkeur telkens in een standaardgebied en op hetzelfde tijdstip. Er moet getracht worden verschillen in de observatiecondities tot een minimum te beperken. Alle waargenomen toxiciteitsverschijnselen moeten zorgvuldig worden geregistreerd, met inbegrip van het verloop in de tijd, de duur en de ernst ervan. Er dient onder meer te worden gelet op veranderingen van huid en vacht, ogen en slijmvliezen, het voorkomen van secreties en excreties, en autonome activiteiten (bv. tranenvloed, pilo-erectie, pupilgrootte, abnormaal ademhalingspatroon). Ook veranderingen in de manier van lopen, de houding en de reactie op de behandeling alsmede de aanwezigheid van klonische of tonische bewegingen, stereotypen (bv. abnormaal poetsgedrag, blijven ronddraaien) of bizar gedrag moeten geregistreerd worden.

Vóór de toediening van de teststof en na beëindiging van het onderzoek wordt een oftalmologisch onderzoek uitgevoerd, waarbij gebruik wordt gemaakt van een oftalmoscoop of een even geschikt apparaat. Dit onderzoek wordt bij voorkeur op alle dieren verricht, maar ten minste op die in de groepen met het hoge dosisniveau en in de controlegroepen. Wanneer oogafwijkingen worden vastgesteld, moeten alle dieren worden onderzocht.

Alle dieren moeten ten minste eenmaal per week worden gewogen. Ook het voedselverbruik moet ten minste wekelijks worden gemeten. Indien de teststof met het drinkwater wordt toegediend, moet ook het waterverbruik ten minste wekelijks worden gemeten. Het meten van het waterverbruik kan ook worden overwogen bij voedsel- of maagsondeonderzoeken, gedurende welke de drinkactiviteit kan veranderen.

1.5.5.2. *Hematologie en klinisch-biochemische bepalingen*

Van een bepaalde plek moeten bloedmonsters worden genomen die, voorzover van toepassing, onder gepaste omstandigheden bewaard moeten worden. Aan het einde van de testperiode moeten de monsters worden genomen vlak vóór het doden van de dieren of als onderdeel van de dodingsprocedure.

Aan het begin van de testperiode moeten de volgende hematologische onderzoeken worden verricht: bepaling van het hematocriet en het hemoglobinegehalte, erythrocytentelling, totale en gedifferentieerde telling van de leukocyten, telling van de bloedplaatjes en meting van een maat voor het stollingsvermogen, zoals prothrombinetijd of thromboplastinetijd. Deze onderzoeken moeten vervolgens om de maand of halverwege de testperiode en ten slotte aan het einde van de test worden herhaald.

Klinisch-biochemische bepalingen die bedoeld zijn om wezenlijke toxische effecten in weefsels en met name effecten op de nier en lever te onderzoeken, moeten worden verricht op bloedmonsters die van elk dier worden genomen aan het begin van de testperiode, om de maand of halverwege de test en ten slotte aan het einde van de testperiode. Tot de testgebieden die overwogen moeten worden, behoren elektrolytisch evenwicht, koolhydraatstofwisseling en de lever- en nierwerking. De keuze van specifieke tests wordt beïnvloed door waarnemingen van de werking van de teststof. Vóór het nemen van de bloedmonsters moet de dieren gedurende een voor die diersoort gepaste periode voedsel worden onthouden. Tot de aanbevolen onderzoeken behoren de meting van calcium, fosfor, chloride, natrium, kalium, glucose bij nuchtere toestand, alanineaminotransferase, aspartaataminotransferase, ornithinedecarboxylase, gammaglutamyltranspeptidase, ureumstikstof, albumine, bloedcreatinine, totaal bilirubine en totaal serumewit.

Ten minste aan het begin, vervolgens halverwege en ten slotte aan het einde van de studie moeten urineonderzoeken worden verricht, waarbij de urinemonsters op regelmatige tijdstippen genomen moeten worden. Het volgende moet worden onderzocht: uitzien, volume, osmolaliteit of relatieve dichtheid, pH, eiwit, glucose en bloed/bloedcellen. Wanneer nodig kunnen hieraan nog parameters worden toegevoegd om het onderzoek van de waargenomen effecten te verlengen.

Bovendien moet worden overwogen markers van algemene weefselbeschadiging te onderzoeken. Andere bepalingen die nodig kunnen zijn voor een adequate toxicologische evaluatie zijn: analyse van lipiden, hormonen, het zuur-base-evenwicht, metaëmhoglobine en cholinesteraseremming. Wanneer nodig kunnen hieraan nog klinisch-chemische parameters worden toegevoegd om het onderzoek van de waargenomen effecten te verlengen. Deze moeten voor chemische stoffen in bepaalde klassen of per geval geïdentificeerd worden.

Algemeen is een flexibele aanpak nodig, afhankelijk van de diersoort en het waargenomen en/of verwachte effect van een bepaalde stof.

1.5.5.3. *Macroscopische necropsie*

Bij alle dieren in de studie moet een volledige macroscopische necropsie worden uitgevoerd, waaronder een zorgvuldig onderzoek van het huidoppervlak, alle lichaamsopeningen alsmede de schedelholte, de borstholte en de buikholte, en de inhoud daarvan. Lever, nieren, bijniere, testes, epididymides, uterus, ovaria, thymus, milt, hersenen en het hart van alle dieren (afgezien van stervende en/of tussentijds gedode dieren) moeten zo nodig ontdaan worden van aanhechtend weefsel, en ze moeten zo spoedig mogelijk na de sectie nat worden gewogen om te voorkomen dat ze uitdrogen.

De volgende weefsels moeten in een medium worden bewaard dat zowel voor het type weefsel als voor het beoogde latere histopathologische onderzoek geschikt is: elk macroscopisch waarneembaar letsel, hersenen (alle relevante delen, waaronder cerebrum, cerebellum en merg/brug), ruggenmerg (op drie niveaus: cervicaal, middenthoracaal en lumbaal), hypofyse, ogen, schildklier, bijschildklier, thymus, slokdarm, speekselklieren, maag, dunne en dikke darmen (met in begrip van de eilandjes van Peyer), lever, galblaas, alveoleklieren, nieren, bijniere, milt, hart, luchtpijp en longen, aorta, geslachtsklieren, uterus, bijbehorende geslachtsorganen, borstklieren van wijfjes, prostaat, urineblaas, lymfklieren (bij voorkeur één lymfklier op de toedieningsroute en één op een afstand van de toedieningsroute om systemische effecten op te vangen), perifere zenuw (grote beenzenuw of scheenbeen) bij voorkeur zeer dicht bij de spier, een beenmergsectie (en/of een vers

beenmergaspiraats) en huid. Uit de klinische en andere bevindingen kan de noodzaak blijken verder weefsel te onderzoeken. Ook organen waarvan op basis van de bekende eigenschappen van de teststof verondersteld wordt dat ze beschadigd kunnen worden, moeten worden bewaard.

#### 1.5.5.4. *Histopathologisch onderzoek*

Bij alle dieren in de groep behandeld met het hoogste dosisniveau en bij de dieren in de controlegroep moet een volledig histopathologisch onderzoek worden verricht op de bewaarde organen en weefsels. Organen en weefsels die blijken te zijn beschadigd door de teststof op het hoogste dosisniveau, moeten in alle groepen met een lagere dosering worden onderzocht.

Alle macroscopisch waarneembare beschadigingen moeten onderzocht worden.

Bij het histopathologisch onderzoek van de dieren in de satellietgroepen moet speciaal worden gelet op die organen en weefsels waarin effecten blijken te zijn opgetreden bij de andere behandelde groepen.

## 2. **GEGEVENS EN RAPPORTAGE**

### 2.1. **GEGEVENS**

Er moeten individuele gegevens voor iedere testgroep worden verstrekt. Bovendien moeten alle gegevens worden samengevat in tabellen die voor iedere testgroep laten zien: het aantal dieren aan het begin van het onderzoek, het aantal dieren dat tijdens de test is gestorven of humaan moest worden gedood en het tijdstip waarop de dood bij de individuele dieren is ingetreden, het aantal dieren dat toxiciteitsverschijnselen vertoont, een beschrijving van de waargenomen toxische effecten, met inbegrip van het verloop in de tijd, de duur en de ernst van eventuele toxische effecten, het aantal dieren dat beschadigingen vertoont, de aard van de beschadigingen en het percentage dieren dat elk type beschadiging vertoont.

Voorzover van toepassing moeten alle waargenomen resultaten met behulp van een geschikte en algemeen erkende statistische methode worden geëvalueerd. De statistische methoden en de te analyseren gegevens moeten tijdens het ontwerp van het onderzoek worden gekozen.

### 2.2. **VERSLAG VAN HET ONDERZOEK**

In het verslag moeten de volgende gegevens worden opgenomen:

#### 2.2.1. **Teststof:**

- fysieke aard, zuiverheid en fysico-chemische eigenschappen,
- identificatiegegevens,
- medium (waar van toepassing): rechtvaardiging van het gekozen medium wanneer dat geen water is.

#### 2.2.2. **Diersoort:**

- gebruikte diersoort en stam,
- aantal, leeftijd en geslacht van de dieren,
- herkomst, leefomstandigheden, voeding enz.,
- gewicht van elk dier aan het begin van de proef.

#### 2.2.3. **Proefomstandigheden:**

- redenen voor de keuze van het dosisniveau,
- details over de samenstelling van de teststof en voedselbereiding, gerealiseerde concentratie, stabiliteit en homogeniteit van het preparaat,

- details over de toediening van de teststof,
- toegepaste, werkelijke doses (mg/kg lichaamsgewicht/dag) en conversiefactor van de teststofconcentratie (ppm) in het voedsel/drinkwater naar de werkelijke dosis, voorzover van toepassing,
- details over de kwaliteit van het voedsel en het drinkwater.

#### 2.2.4. **Resultaten:**

- lichaamsgewicht en veranderingen in het lichaamsgewicht,
- waar van toepassing voedselverbruik en waterverbruik,
- gegevens over de toxische reacties naar geslacht en dosis, inclusief toxiciteitsverschijnselen,
- aard, ernst en duur van de klinische waarnemingen (al dan niet reversibel),
- uitgevoerd oftalmologisch onderzoek,
- uitgevoerde hematologische onderzoeken en alle resultaten,
- uitgevoerde klinisch-biochemische onderzoeken en alle resultaten,
- lichaamsgewicht, orgaangewichten en verhoudingen lichaams-/orgaangewicht van gestorven dieren,
- bevindingen bij de necropsie,
- een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen,
- indien beschikbaar absorptiegegevens,
- waar van toepassing statistische behandeling van de resultaten.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

---

## B.28 SUBCHRONISCHE DERMAL TOXICITEITSTEST

### 90 DAGEN-TEST MET HERHAALDE DERMAL TOEDIENING AAN KNAAGDIERSOORTEN

#### 1. METHODE

##### 1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

##### 1.2. Definities

Zie Algemene inleiding — Deel B.

##### 1.3. Referentiestoffen

Geen.

##### 1.4. Principe van de onderzoekmethode

De teststof wordt gedurende een periode van 90 dagen dagelijks in geleidelijk stijgende doseringen bij verscheidene groepen proefdieren op de huid aangebracht. Er wordt een dosis per groep gebruikt. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks op tekenen van toxiciteit onderzocht. Op de dieren die tijdens het onderzoek sterven en die welke aan het eind van de proefnemingen nog in leven zijn, wordt necropsie verricht.

##### 1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

##### 1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

###### *Vorbereidingen*

Voor het onderzoek worden de dieren ten minste vijf dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Voor het onderzoek worden gezonde, jonge dieren op willekeurige wijze in de te behandelen groepen en controlegroepen ingedeeld. Kort voor de proefneming wordt het haar op het ruggedeelte van de romp van de proefdieren geknipt. Het dier kan ook worden geschoren, maar dit moet dan ongeveer 24 uur voor de proef worden uitgevoerd. Gewoonlijk zal het dier ongeveer om de week opnieuw moeten worden geknipt of geschoren. Bij het knippen of scheren van de vacht moet erop worden gelet dat de huid niet wordt beschadigd. Ten minste 10% van de lichaamsoppervlakte moet voor de aanbrenging van de teststof worden onthaard. Bij het bepalen van de oppervlakte die moet worden onthaard, en de afmetingen van het verband moet rekening worden gehouden met het gewicht van het dier. Bij proefnemingen met vaste stoffen, die eventueel tot poeder kunnen worden fijngemalen, moet de teststof voldoende met water of, zo nodig, met een passend medium worden bevochtigd, zodat de stof goed in contact met de huid komt. Vloeibare teststoffen worden in het algemeen onverdund gebruikt. De teststof wordt gedurende vijf tot zeven dagen per week dagelijks aangebracht.

###### *Proefomstandigheden*

###### *Proefdieren*

Er kan gebruik worden gemaakt van volwassen ratten, konijnen of cavia's. Ook andere diersoorten kunnen worden gebruikt, maar de noodzaak hiervan moet worden aangetoond. Bij het begin van het onderzoek mag het gewicht van de dieren niet meer dan  $\pm 20\%$  van het gemiddelde gewicht afwijken.

Indien een studie naar de subchronische dermale toxiciteit wordt verricht ter voorbereiding op een chronisch onderzoek, dienen in beide studies dezelfde soort en stam te worden gebruikt.

###### *Aantal en geslacht*

Voor ieder dosisniveau moeten ten minste twintig dieren (tien wijfjes en tien mannetjes) met een gezonde huid worden gebruikt. De vrouwtjes moeten nulliparae zijn en mogen niet drachtig zijn. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal worden verhoogd met het aantal dieren dat volgens plan voor de voltooiing van de studie zal worden gedood. Daarnaast kan een satellietgroep van twintig dieren (tien per geslacht) gedurende 90 dagen met het hoge dosisniveau worden behandeld en nog gedurende 28 dagen na de behandeling worden geobserveerd om na te gaan of de toxische effecten eventueel verdwijnen, voortduren of vertraagd tot uiting komen.



## Dosisniveaus

Er zijn ten minste drie dosisniveaus vereist, met een controle of een mediumcontrole indien een medium wordt gebruikt. De blootstellingsduur dient ten minste zes uur per dag te bedragen. De teststof moet iedere dag op dezelfde tijd worden toegediend; op gezette tijden (iedere week of om de veertien dagen) is een correctie vereist om ervoor te zorgen dat het dosisniveau in verhouding tot het lichaamsgewicht van het dier constant blijft. Afgezien van de toediening van de teststof, moeten de dieren in de controlegroep op dezelfde wijze worden behandeld als de dieren in de proefgroep. Indien ter vergemakkelijking van de dosering gebruik wordt gemaakt van een medium, moet aan de dieren in de mediumcontrolegroep de dosis op dezelfde wijze worden toegediend als aan de dieren in de behandelde groepen en moet deze dosis even groot zijn als die van de dieren in de groep met het hoogste dosisniveau. Het hoogste dosisniveau moet leiden tot toxische effecten, maar er mogen geen of weinig sterfgevallen voorkomen. Bij het laagste dosisniveau mogen geen tekenen van toxiciteit optreden. Wanneer er een bruikbare schatting van de menselijke blootstelling bestaat, moet het laagste niveau deze overschrijden. In het ideale geval treden bij het middelste dosisniveau nauwelijks waarneembare toxische effecten op. Bij meer dan één tussendosis moet het verschil tussen de dosisniveaus zo groot zijn dat een gradatie in toxische effecten wordt verkregen. In de groep met de geringe dosis en in de tussengroepen alsmede in de controlegroepen mogen niet veel sterfgevallen voorkomen, omdat anders een zinvolle evaluatie van de resultaten niet mogelijk is.

Indien toediening van de teststof tot ernstige huidirritatie leidt, moeten de concentraties worden verlaagd, wat vermindering of uitblijven van andere toxische effecten bij het hoge dosisniveau tot gevolg kan hebben. Indien de huid ernstig is beschadigd, kan het bovendien noodzakelijk zijn de studie te beëindigen en een nieuwe studie met lagere concentraties te beginnen.

## Hoogste te testen dosis

Indien bij een voorafgaand onderzoek bij een dosisniveau van 1 000 mg/kg of een hoger niveau, dat is gerelateerd aan het niveau waaraan de mens, voor zover bekend, kan worden blootgesteld, geen toxische effecten optreden, zijn verdere proeven wellicht niet noodzakelijk.

## Observatieperiode

De proefdieren moeten dagelijks worden onderzocht op tekenen van toxiciteit. Het tijdstip waarop de dood intreedt, het tijdstip waarop de toxiciteitsverschijnselen zich voor het eerst voordoen, en het tijdstip waarop zij weer verdwijnen, moeten worden vastgelegd.

## Uitvoering

De dieren moeten apart in kooien worden ondergebracht. De dieren worden in het ideale geval gedurende een periode van 90 dagen, zeven dagen per week, met de teststof behandeld.

Dieren in satellietgroepen voor latere waarnemingen moeten nog 28 dagen onbehandeld blijven om herstel of voortduren van de toxische effecten te kunnen vaststellen. De blootstellingsduur moet zes uur per dag bedragen.

De teststof moet gelijkmatig worden verdeeld over een oppervlakte van ongeveer 10% van de totale lichaamsoppervlakte. Bij zeer toxische stoffen mag de te bedekken oppervlakte kleiner zijn, maar een zo groot mogelijke oppervlakte moet met een zo dun en gelijkmatig mogelijk aangebrachte laag worden bedekt.

De teststof moet voor de duur van de blootstelling door middel van poreus verbandgaas en niet-irriterend plakband in contact met de huid blijven. Dit gedeelte van de huid moet op een geschikte wijze nog verder worden bedekt om het verbandgaas en de teststof op hun plaats te houden en om te verhinderen dat de dieren de teststof oraal opnemen. Om dit te voorkomen kunnen hulpmiddelen worden gebruikt waarmee de dieren in hun bewegingsvrijheid worden belemmerd, maar het is niet aan te bevelen de bewegingsvrijheid van de dieren volledig te beperken.

Aan het eind van de blootstellingsperiode wordt de resterende teststof waar mogelijk met water van de huid verwijderd of anderszins door middel van een andere geschikte schoonmaakmethode.

Alle dieren moeten dagelijks worden gecontroleerd; tekenen van toxiciteit moeten samen met het tijdstip waarop deze voor het eerst zijn opgetreden, de mate en de duur ervan worden genoteerd. Bij het observeren van de dieren in de kooien moet aandacht worden besteed aan veranderingen in huid en vacht, ogen en slijmvliezen, ademhaling, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag. Het verbruik van voer moet wekelijks worden gemeten en de dieren moeten iedere week worden gewogen. De dieren moeten regelmatig worden geobserveerd om te voorkomen dat zij voor de studie verloren gaan als gevolg van oorzaken als kannibalisme, autolyse van weefsels of verkeerde huisvesting. Na afloop van de onderzoeksperiode wordt op alle overlevende dieren van de behandelde groepen, afgezien van die in de satellietgroepen, necropsie verricht. Indien stervende dieren worden aangetroffen, moeten zij worden verwijderd; ook op hen wordt necropsie verricht.

Bij alle dieren, met inbegrip van die uit de controlegroep, worden gewoonlijk de volgende onderzoeken verricht:

- a) Voor de blootstelling aan de teststof en na afloop van het onderzoek dient bij voorkeur bij alle dieren, maar ten minste bij de groep met de hoge dosis en de controlegroep oogonderzoek met behulp van een oogspiegel of een ander voor dit doel geschikt instrument plaats te vinden. Indien er veranderingen in de ogen worden vastgesteld, moeten alle dieren worden onderzocht.

- b) Aan het einde van de onderzoeksperiode vindt een hematologisch onderzoek plaats, dat onder meer omvat: bepaling van het hematocriet en het hemoglobinegehalte, telling van de erythrocyten, totaalstelling en gedifferentieerde telling van de leukocyten, alsmede meting van de stollingseigenschappen zoals stollingstijd, protrombintijd en tromboplastinetijd, of telling van de bloedplaatjes.
- c) Aan het einde van de onderzoeksperiode dienen klinische en biochemische bepalingen op het bloed te worden verricht. Voor alle studies in aanmerking komende testen zijn: elektrolytenbalans, koolhydraatstofwisseling, alsmede de lever- en nierfunctie. De selectie van specifieke testen is afhankelijk van de waarnemingen met betrekking tot het werkingsmechanisme van de stof. Het onderzoek is eventueel uit te breiden met metingen van: calcium, fosfor, chloride, natrium, kalium, nuchter glucosegehalte (met een aan de diersoort aangepaste periode van vasten), serumglutamaatpyruvaattransaminase<sup>(1)</sup>, serumglutamaatoxaalacetaattransaminase<sup>(2)</sup>, ornithinedecarboxylase, gammaglutamyltranspeptidase, ureumstikstof, albumine, bloedcreatinine, totaal bilirubine en totaal serumproteïne.
- Voor een goede toxicologische evaluatie kan de bepaling van de lipiden, hormonen, zuur/base-evenwicht, methemoglobine en cholinesterase-activiteit noodzakelijk zijn. Om het onderzoek van de waargenomen effecten uit te breiden kan zo nodig verder klinisch-biochemisch onderzoek worden verricht.
- d) Routinematig urineonderzoek is alleen vereist wanneer daartoe op grond van de verwachte of waargenomen toxiciteit een indicatie bestaat.

In het geval van ontoereikende basisgegevens uit het verleden dient de bepaling van hematologische en klinisch-biochemische parameters voordat met de dosering wordt begonnen aandacht te krijgen.

### Macroscopische necropsie

Op alle dieren moet een volledige macroscopische necropsie worden verricht, waarbij het uitwendige lichaamsoppervlak, alle lichaamsopeningen, alsmede de schedel-, borst- en buikholte en hun inhoud worden onderzocht. De lever, nieren, bijnieren en testes moeten zo spoedig mogelijk na de sectie nat worden gewogen om uitdroging te voorkomen. De volgende organen en weefsels moeten in een geschikt medium worden bewaard voor eventueel later histopathologisch onderzoek: alle organen die met het blote oog zichtbare letsels vertonen, hersenen — inclusief delen van medulla/pons, cortex cerebelli en cortex cerebri, hypofyse, schildklier/bijschildklieren, thymusweefsel, (luchtpijp), longen, hart, aorta, speekselklieren, lever, milt, nieren, bijnieren, alveesklier, geslachtsklieren, secundaire geslachtsorganen, galblaas (indien aanwezig), slokdarm, maag, duodenum, jejunum, ileum, blinde darm, colon, rectum, urineblaas, representatieve lymfklieren, (vrouwelijke borstklier), (dijbeenspieren), perifere zenuwen, (ogen), (borstbeen met beenmerg), (dijbeen — inclusief gewrichtsvlak), (ruggemerg op drie plaatsen — cervicaal, mediotoracaal en lumbaal) en (traanklieren). (De tussen haakjes vermelde weefsels hoeven alleen te worden onderzocht als daarvoor aanwijzingen zijn vanwege toxicologische waarnemingen of als het orgaan is aangetast.)

### Histopathologisch onderzoek

- a) Op de normale en behandelde huid en de organen en weefsels van alle dieren in de controlegroep en in de groep die de hoogste dosis heeft ontvangen, moet een volledig histopathologisch onderzoek worden verricht.
- b) Alle met het blote oog zichtbare letsels moeten worden onderzocht.
- c) De aangetaste organen dienen in dieren in andere dosisgroepen te worden onderzocht.
- d) Bij gebruikmaking van ratten dienen de longen van de dieren in de groep die een lage dosis heeft ontvangen en van die in de tussengroep histopathologisch te worden onderzocht op tekenen van infectie, aangezien op deze manier een goed beeld van de gezondheidstoestand van de dieren wordt verkregen. Verder routinematig histopathologisch onderzoek is bij de dieren in deze groepen niet vereist, maar moet steeds worden verricht op de organen die in de groep die een hoge dosis heeft ontvangen, letsels bleken te vertonen.
- e) Wordt van een satellietgroep gebruik gemaakt, dan moet histopathologisch onderzoek worden verricht op de weefsels en organen waar bij andere behandelde groepen effecten blijken te zijn opgetreden.

## 2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het aantal dieren dat letsels vertoont, de aard van de letsels en het percentage dieren waarbij ieder type letsel voorkomt. De resultaten moeten met behulp van een voor dit doel geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

<sup>(1)</sup> Thans bekend als serumalanineaminotransferase.

<sup>(2)</sup> Thans bekend als serumaspartaataminotransferase.

### 3. VERSLAGGEVING

#### 3.1. Verslag van de proefnemingen

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voer, enzovoort;
- proefomstandigheden;
- dosisniveaus (met het eventuele medium) en concentraties;
- waar mogelijk, het dosisniveau waarop geen effect is waargenomen;
- gegevens over de toxische reactie naar geslacht en dosis;
- tijdstip gedurende de studie waarop de dood intreedt of aangeven of dieren tot het einde van de proef in leven bleven;
- beschrijving van toxische of andere effecten;
- tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en verloop hiervan;
- gegevens over voer en lichaamsgewicht;
- oftalmologische bevindingen;
- uitgevoerd hematologisch onderzoek en resultaten;
- uitgevoerd klinisch-biochemisch onderzoek en resultaten (resultaten van het urineonderzoek inbegrepen);
- bevindingen van de necropsie;
- gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
- waar toepasselijk, statistische verwerking van de resultaten;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

#### 3.2. Evaluatie en interpretatie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

### 4. LITERATUUR

Zie Algemene inleiding — Deel B.

---

## B.29 SUBCHRONISCHE INHALATIETOXICITEITSTEST

### 90 DAGEN-TEST MET HERHAALDE INHALATOIRE TOEDIENING AAN KNAAGDIERSOORTEN

#### 1. METHODE

##### 1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

##### 1.2. Definities

Zie Algemene inleiding — Deel B.

##### 1.3. Referentiestoffen

Geen.

##### 1.4. Principe van de onderzoekmethode

Verscheidene groepen proefdieren worden gedurende een periode van 90 dagen dagelijks voor een bepaalde tijd aan geleidelijk stijgende concentraties van de teststof blootgesteld. Er wordt een concentratie per groep gebruikt. Indien een medium wordt gebruikt om de juiste concentratie van de teststof in de atmosfeer te bereiken, moet een mediumcontrolegroep worden gebruikt. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks op tekenen van toxiciteit onderzocht. Op de dieren die tijdens het onderzoek sterven en die welke aan het einde van de proefnemingen nog in leven zijn, wordt necropsie verricht.

##### 1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

##### 1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

###### *Voorbereidingen*

Voor het onderzoek worden de dieren ten minste vijf dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Voor het onderzoek worden gezonde, jonge dieren op willekeurige wijze in de te behandelen en controlegroepen ingedeeld. Waar nodig wordt een passend medium aan de teststof toegevoegd, ten einde de juiste concentratie van de teststof in de atmosfeer te bereiken. Indien een medium of andere additieven worden gebruikt om de dosering te vergemakkelijken, moet daarvan bekend zijn dat zij geen toxische effecten veroorzaken. Eventueel kan gebruik worden gemaakt van bestaande gegevens.

###### *Proefomstandigheden*

###### **Proefdieren**

Tenzij er contra-indicaties zijn, wordt de voorkeur gegeven aan ratten. Er dient gebruik te worden gemaakt van stammen van jonge, gezonde dieren die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt. Bij het begin van het onderzoek mag het gewicht van de dieren die bij de proeven worden gebruikt, niet meer dan  $\pm 20\%$  van het gemiddelde gewicht afwijken. Indien een studie naar de subchronische inhalatiotoxiciteit wordt verricht ter voorbereiding op een langdurig onderzoek, dienen in beide studies dezelfde soort en stam te worden gebruikt.

###### **Aantal en geslacht**

Iedere testgroep moet uit ten minste twintig dieren (tien wijfjes en tien mannetjes) bestaan. De vrouwtjes moeten nulliparae zijn en mogen niet drachtig zijn. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal worden verhoogd met het aantal dieren dat volgens plan voor de voltooiing van de studie zal worden gedood. Daarnaast kan een satellietgroep van twintig dieren (tien per geslacht) gedurende 90 dagen met het hoge concentratieniveau worden behandeld en nog gedurende 28 dagen na de behandeling worden geobserveerd om na te gaan of de toxische effecten eventueel verdwijnen, voortduren of vertraagd tot uiting komen.

## Blootstellingsconcentraties

Er zijn ten minste drie concentraties vereist, met een controle of een mediumcontrole (overeenkomend met de concentratie van het medium bij het hoogste expositieniveau) indien een medium wordt gebruikt. Afgezien van de toediening van de teststof, moeten de dieren in de controlegroep op dezelfde wijze worden behandeld als de dieren in de behandelde groep. De hoogste concentratie moet leiden tot toxische effecten, maar er mogen geen of weinig sterfgevallen voorkomen. Bij de laagste concentratie mogen geen tekenen van toxiciteit optreden. Wanneer er een bruikbare schatting van de menselijke blootstelling bestaat, moet de laagste concentratie deze overschrijden. In het ideale geval treden bij de middelste concentratie nauwelijks waarneembare toxische effecten op. Bij meer dan één tussenconcentratie moet het verschil tussen de concentraties zo groot zijn dat een gradatie in toxische effecten wordt verkregen. In de groep met de geringe concentratie en in de tussenliggende groepen, alsmede in de controlegroepen mogen niet veel sterfgevallen voorkomen, omdat anders een zinvolle evaluatie van de resultaten niet mogelijk is.

## Duur van de blootstelling

De dagelijkse blootsteldingsduur bedraagt zes uur nadat in de verschillende kamers de juiste concentratie is bereikt. De blootsteldingsduur kan eventueel aan specifieke behoeften worden aangepast.

## Apparatuur

De dieren worden aan de teststof blootgesteld met behulp van inhalatieapparatuur die zodanig gebouwd moet zijn dat kan worden gezorgd voor een dynamische luchtdoorstroming van ten minste twaalf luchtverversingen per uur, een toereikend zuurstofgehalte en een gelijkmatige verdeling van de teststof in de atmosfeer. Als van een blootstellingskamer gebruik wordt gemaakt, moet deze op zodanige wijze zijn ontworpen dat de dieren elkaar zo min mogelijk verdringen en zoveel mogelijk door inhalatie aan de teststof worden blootgesteld. Als algemene regel voor het verzekeren van een stabiele atmosfeer in de expositiekamer geldt dat het totale „volume” van de proefdieren niet meer mag bedragen dan 5 % van het volume van de blootstellingskamer. Naar keuze kan de oro-nasale methode worden toegepast, de kop alleen worden blootgesteld of het gehele lichaam in een afzonderlijke ruimte worden blootgesteld; met de eerste twee methoden wordt bereikt dat zo min mogelijk van de teststof via andere wegen in het lichaam wordt opgenomen.

## Observatieperiode

De proefdieren moeten tijdens de gehele periode van behandeling en herstel dagelijks op tekenen van toxiciteit worden onderzocht. Het tijdstip waarop de dood intreedt, het tijdstip waarop de toxiciteitsverschijnselen zich voor het eerst voordoen, en het tijdstip waarop zij weer verdwijnen, moeten worden vastgelegd.

## Uitvoering

De dieren worden gedurende een periode van 90 dagen vijf tot zeven dagen per week aan de teststof blootgesteld. Dieren in satellietgroepen voor latere waarnemingen moeten nog 28 dagen onbehandeld blijven om herstel of voortduren van de toxische effecten te kunnen vaststellen. Tijdens de proefnemingen dient de temperatuur op 22 °C ( $\pm$  3 °C) te worden gehouden. In het ideale geval moet de relatieve vochtigheid tussen 30 % en 70 % worden gehouden, behalve waar dit niet mogelijk is (bij voorbeeld bij het testen van sommige aerosolen). Gedurende de blootstelling wordt de dieren voedsel en water onthouden.

Er moet gebruik worden gemaakt van een dynamisch inhalatiesysteem met een geschikt systeem voor de analytische controle van de concentratie. Aanbevolen wordt in een verkennende proef vast te stellen welke blootstellingsconcentraties voor de proeven het meest geschikt zijn. Het aantal luchtverversingen per uur moet worden aangepast, zodat in de gehele blootstellingskamer homogene omstandigheden heersen. Het systeem moet waarborgen dat de omstandigheden bij de proef zo spoedig mogelijk stabiel zijn.

De volgende parameters moeten worden gemeten of gecontroleerd:

- a) Gedurende de hele proef het aantal luchtverversingen per uur.
- b) De feitelijke concentratie van de teststof in de ademhalingsruimte. Tijdens de dagelijkse blootstelling mag de concentratie met niet meer dan  $\pm$  15 % van het gemiddelde afwijken. Bij stof- en vloeistofaerosolen is het mogelijk dat de concentraties niet binnen de gestelde grenzen kunnen worden gehouden; in dat geval kan een grotere afwijking aanvaardbaar zijn. Tijdens de gehele duur van de studie moeten de dagelijkse concentraties zo constant mogelijk worden gehouden. Gedurende het werken van de apparatuur voor het genereren van deeltjes moeten analyses worden uitgevoerd van de deeltjesgrootte, ten einde de stabiliteit van het aerosol vast te stellen. Tijdens de blootstelling moet zo dikwijls als dit noodzakelijk is een analyse worden uitgevoerd om de stabiliteitsconsistentie van de verdeling van de deeltjesgrootte te bepalen.
- c) Temperatuur en vochtigheid.
- d) Tijdens en na de blootstelling worden waarnemingen gedaan die voor elk dier afzonderlijk systematisch worden geregistreerd. Alle dieren moeten dagelijks worden geobserveerd; tekenen van toxiciteit moeten samen met het tijdstip waarop deze voor het eerst zijn opgetreden, de mate en de duur ervan worden vastgelegd. Bij het observeren van de dieren in de kooien wordt in ieder geval aandacht besteed aan veranderingen in huid en vacht, ogen, slijmvliezen, ademhaling, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag. Wekelijks moet het verbruik van voer worden gemeten en moeten de dieren worden gewogen. De dieren moeten regelmatig worden geobserveerd om te vermijden dat ze voor de studie verloren

gaan als gevolg van oorzaken als kannibalisme, autolyse van weefsels of verkeerde huisvesting. Na afloop van de onderzoeksperiode wordt op alle overlevende dieren van de behandelde groepen, afgezien van de dieren in de satellietgroep, necropsie verricht. Wanneer stervende dieren worden aangetroffen, moeten zij worden verwijderd; ook op hen wordt necropsie verricht.

Bij alle dieren, met inbegrip van die uit de controlegroep, worden gewoonlijk de volgende onderzoeken verricht:

- a) Voor expositie aan de teststof en na afloop van het onderzoek dient bij voorkeur bij alle dieren, maar ten minste bij de groep met de hoge dosis en de controlegroep oogonderzoek met behulp van een oogspiegel of een ander voor dit doel geschikt instrument plaats te vinden. Indien er veranderingen in de ogen worden vastgesteld, moeten alle dieren worden onderzocht.
- b) Aan het einde van de onderzoeksperiode vindt een hematologisch onderzoek plaats, dat onder meer omvat: bepaling van het hematocriet en het hemoglobinegehalte, telling van de erythrocyten, totaalstelling en gedifferentieerde telling van de leukocyten, alsmede meting van de stollingseigenschappen zoals stollingstijd, protrombinetijd en tromboplastinetijd, of telling van de bloedplaatjes.
- c) Aan het einde van de onderzoeksperiode dienen klinische en biochemische bepalingen op het bloed te worden verricht. Voor alle studies in aanmerking komende testen zijn: elektrolytenbalans, koolhydraatstofwisseling, alsmede de lever- en nierfunctie. De selectie van specifieke testen is afhankelijk van de waarnemingen met betrekking tot het werkingsmechanisme van de stof. Het onderzoek is eventueel uit te breiden met metingen van: calcium, fosfor, chloride, natrium, kalium, nuchter glucosegehalte (met een aan de diersoort aangepaste periode van vasten), serumglutamaatpyruvaattransaminase <sup>(1)</sup>, serumglutamaatoxaalacetaattransaminase <sup>(2)</sup>, ornithinedecarboxylase, gammaglutamyltranspeptidase, ureumstikstof, albumine, bloedcreatinine, totaal bilirubine en totaal serumproteïne. Voor een goede toxicologische evaluatie kan de bepaling van de lipiden, hormonen, zuur/base-evenwicht, methemoglobine en cholinesterase-activiteit noodzakelijk zijn. Om het onderzoek van de waargenomen effecten verder uit te breiden, kan zo nodig verder klinisch-biochemisch onderzoek worden verricht.
- d) Routinematig urineonderzoek is alleen vereist wanneer daartoe op grond van de verwachte of waargenomen toxiciteit een indicatie bestaat.

In het geval van ontoereikende basisgegevens uit het verleden dient de bepaling van hematologische en klinisch-biochemische parameters voordat met de toediening wordt begonnen aandacht te krijgen.

#### Macroscopische necropsie

Op alle dieren moet een volledige macroscopische necropsie worden verricht, waarbij het uitwendige lichaamsoppervlak, alle lichaamsopeningen, alsmede de schedel-, borst- en buikholte en hun inhoud worden onderzocht. De lever, nieren, bijnieren en testes moeten zo spoedig mogelijk na de sectie nat worden gewogen om uitdroging te voorkomen. De volgende organen en weefsels moeten in een geschikt medium worden bewaard voor eventueel later histopathologisch onderzoek: alle organen die met het blote oog zichtbare letsels vertonen, longen — die in hun geheel moeten worden verwijderd, gewogen en behandeld met een geschikt fixatief om ervoor te zorgen dat de longstructuur intact blijft (perfusie met een fixatief wordt als een doeltreffende methode beschouwd), weefsels van de nasopharynx, hersenen — inclusief delen van medulla/pons, cortex cerebelli en cortex cerebri, hypofyse, schildklier/bij schildklieren, thymusweefsel, luchtpijp, hart, aorta, speekselklieren, lever, milt, nieren, bijnieren, alvleesklier, geslachtsklieren, uterus, (secundaire geslachtsorganen), (huid), galblaas (indien aanwezig), slokdarm, maag, duodenum, jejunum, ileum, blinde darm, colon, rectum, urineblaas, representatieve lymfklieren, (vrouwelijke borstklier), (dijbeenspieren), perifere zenuwen, (ogen), borstbeenderen met beenmerg, (dijbeenderen — inclusief gewrichtsvlak), (ruggemerg op drie plaatsen — cervicaal, mediotoracaal en lumbaal) en (traanklieren). (De tussen haakjes vermelde weefsels hoeven alleen te worden onderzocht als daarvoor aanwijzingen zijn vanwege toxicologische waarnemingen of als het orgaan is aangetast.)

#### Histopathologisch onderzoek

- a) Op de ademhalingswegen en andere organen weefsels van alle dieren in de controlegroep en de groep die de hoogste dosis heeft ontvangen, moet een volledig histopathologisch onderzoek worden verricht.
- b) Alle met het blote oog zichtbare letsels moeten worden onderzocht.
- c) De aangetaste organen dienen in dieren in andere dosisgroepen te worden onderzocht.
- d) De longen van de dieren in de groep die een lage dosis heeft ontvangen, en van die in de tussengroep dienen ook histopathologisch te worden onderzocht, aangezien op deze manier een goed beeld van de gezondheidstoestand van de dieren wordt verkregen. Verder routinematig histopathologisch onderzoek is bij de dieren in deze groepen als vaste regel niet vereist, maar moet steeds worden verricht op de organen die in de groep die een hoge dosis heeft ontvangen, letsels bleken te vertonen.
- e) Wordt van een satellietgroep gebruik gemaakt, dan moet histopathologisch onderzoek worden verricht op de weefsels en organen waar bij andere behandelde groepen effecten blijken te zijn opgetreden.

<sup>(1)</sup> Thans bekend als serumalanineaminotransferase.

<sup>(2)</sup> Thans bekend als serumaspartaataminotransferase.

## 2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het aantal dieren dat letsels vertoont, de aard van de letsels en het percentage dieren waarbij ieder type letsel voorkomt. De resultaten moeten met behulp van een voor dit doel geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

## 3. VERSLAGGEVING

### 3.1. Verslag van de proefnemingen

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voer, enz.;
- proefomstandigheden:

*Beschrijving van de blootstellingsapparatuur:* met inbegrip van ontwerp, type, afmetingen, luchtbron, systeem voor het bereiden van stof- en vloeistofaërosolen, methoden voor het conditioneren van de lucht, behandeling van de afgewerkte lucht en wijze waarop de dieren tijdens de proeven in een blootstellingskamer zijn ondergebracht als deze wordt gebruikt. Er moet een beschrijving worden gegeven van de apparatuur voor het meten van de temperatuur, de vochtigheid en, in voorkomend geval, de stabiliteit van de concentratie en de deeltjesgrootte van de aërosolen.

*Gegevens betreffende de blootstelling:* deze moeten in tabelvorm worden gerangschikt en worden voorzien van gemiddelde waarden en een maat voor de variabiliteit (bij voorbeeld standaarddeviatie). Zij dienen te omvatten:

- a) het aantal luchtverversingen per uur in de inhalatieapparatuur;
  - b) temperatuur en vochtigheid van de lucht;
  - c) nominale concentraties (de totale hoeveelheid teststof die de inhalatieapparatuur wordt binnengeleid, gedeeld door het luchtvolume);
  - d) aard van het eventuele medium;
  - e) feitelijke concentraties van de teststof in de ademhalingsruimte van de dieren;
  - f) mediaan van de deeltjesgrootte (in voorkomend geval).
- gegevens over de toxische reactie naar geslacht en concentratie;
  - waar mogelijk het dosisniveau waarop geen effect is waargenomen;
  - tijdstip gedurende de studie waarop de dood intreedt of aangeven of dieren tot het einde van de proef in leven bleven;
  - beschrijving van toxische of andere effecten; niveau waarop de concentratie geen effect heeft;
  - tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en verloop hiervan;
  - gegevens over voer en lichaamsgewicht;
  - oftalmologische bevindingen;
  - uitgevoerd hematologisch onderzoek en resultaten;
  - uitgevoerd klinisch-biochemisch onderzoek en resultaten (resultaten van het urineonderzoek inbegrepen);
  - bevindingen van de necropsie;
  - gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
  - waar toepasselijk, statistische verwerking van de resultaten;
  - bespreking van de resultaten;
  - interpretatie van de resultaten.

### 3.2. Evaluatie en interpretatie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

## 4. LITERATUUR

Zie Algemene inleiding — Deel B.

---

## B.30 CHRONISCHE TOXICITEITSTEST

### 1. METHODE

#### 1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

#### 1.2. Definities

Zie Algemene inleiding — Deel B.

#### 1.3. Referentiestoffen

Geen.

#### 1.4. Principe van de onderzoeksmethode

De teststof wordt normaal gesproken zeven dagen per week langs een geschikte weg aan verscheidene groepen proefdieren gedurende een groot deel van hun levensduur toegediend. Er wordt een dosis per groep gebruikt. Tijdens en na de blootstelling aan de teststof worden de proefdieren dagelijks op tekenen van toxiciteit onderzocht.

#### 1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

#### 1.6. Beschrijving van de onderzoeksmethode

##### *Vorbereidingen*

Voor het onderzoek worden de dieren ten minste vijf dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Voor het onderzoek worden gezonde, jonge dieren op willekeurige wijze in de te behandelen en controlegroepen ingedeeld.

##### *Proefomstandigheden*

##### *Proefdieren*

Er wordt de voorkeur gegeven aan ratten. Op grond van de resultaten van eerder uitgevoerd onderzoek mogen ook andere diersoorten (knaagdieren of niet-knaagdieren) worden gebruikt. Er dient gebruik te worden gemaakt van stammen van jonge, gezonde dieren die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt. Met de dosering dient zo spoedig mogelijk na het verspenen te worden begonnen.

Bij het begin van het onderzoek mag het gewicht van de dieren niet meer dan  $\pm 20\%$  van het gemiddelde gewicht afwijken. Indien een studie naar de subchronische orale toxiciteit is uitgevoerd ter voorbereiding op een chronisch toxiciteitsonderzoek, dienen in beide studies dezelfde soort en stam te worden gebruikt.

##### *Aantal en geslacht*

Bij knaagdieren moeten voor ieder dosisniveau en de parallelle controlegroep ten minste 40 dieren (20 wijfjes en 20 mannetjes) worden gebruikt. De wijfjes moeten nulliparae zijn en mogen niet drachtig zijn. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal worden verhoogd met het aantal dieren dat volgens plan voor de voltooiing van de studie zal worden gedood.

In het geval van niet-knaagdieren kan worden volstaan met een kleiner aantal dieren, doch ten minste vier per geslacht per groep.

##### *Dosisniveaus en frequentie van de blootstelling*

Naast de parallelle controlegroep dienen ten minste drie dosisniveaus te worden gebruikt. Het hoogste dosisniveau moet leiden tot duidelijke tekenen van toxiciteit, zonder dat het evenwel leidt tot overmatige sterfte onder de dieren. Bij het laagste dosisniveau mogen geen tekenen van toxiciteit optreden.



De tussenliggende doses moeten worden gekozen in een gebied halverwege tussen de hoge en de lage dosis.

Bij de keuze van de dosisniveaus dient rekening te worden gehouden met de gegevens uit eerder uitgevoerd toxiciteitsonderzoek.

De frequentie van de blootstelling is normaliter dagelijks. Indien de teststof in het drinkwater wordt toegediend of met het voer wordt gemengd, dient dit steeds beschikbaar te zijn.

### Controlegroepen

Er dient gebruik te worden gemaakt van een parallelle controlegroep die, afgezien van de blootstelling aan de teststof, in elk opzicht identiek is aan de behandelde groepen.

In speciale omstandigheden, zoals bij inhalatiestudies met aerosolen of bij het gebruik van een emulgator van niet-gekaracteriseerde biologische activiteit in orale studies, dient ook een negatieve controlegroep te worden gebruikt. De negatieve controlegroep wordt op dezelfde wijze behandeld als alle andere proefdieren, met dien verstande dat deze controlegroep niet aan de teststof of een medium moet worden blootgesteld.

### Toedieningsweg

Toediening geschiedt voornamelijk oraal of via inhalatie. De keuze van de toedieningsweg hangt af van de fysische en chemische eigenschappen van de teststof en de meest waarschijnlijke blootstellingsweg bij de mens.

Toediening via de huid levert aanzienlijke praktische problemen op. Chronische systemische toxiciteit die het resultaat is van opname via de huid, kan normaal gesproken worden afgeleid uit de resultaten van de orale test en de mate van absorptie via de huid, die kan worden afgeleid uit eerder uitgevoerd onderzoek naar de percutane toxiciteit.

### Orale studies

Indien de teststof in het maag-darmkanaal wordt geresorbeerd, en de blootstelling van de mens onder meer langs orale weg plaatsvindt, verdient orale toediening de voorkeur, tenzij er contra-indicaties zijn.

De dieren moeten de teststof toegediend krijgen in hun voer, opgelost in het drinkwater of in capsules. In het ideale geval dient de dosis zeven dagen per week dagelijks te worden toegediend, omdat bij dosering gedurende vijf dagen per week het dier zich in de tijd dat geen dosis wordt toegediend, eventueel herstelt of de toxiciteitsverschijnselen verdwijnen, waardoor de resultaten en de evaluatie daarvan kunnen worden beïnvloed. Voornamelijk uit praktische overwegingen echter wordt dosering gedurende vijf dagen per week aanvaardbaar geacht.

### Inhalatiestudies

Aangezien bij inhalatiestudies de technische problemen ingewikkelder zijn dan bij andere toedieningswegen het geval is, volgen hieronder meer gedetailleerde aanwijzingen met betrekking tot deze wijze van toediening. In specifieke situaties vormt intratracheale instillatie wellicht een deugdelijk alternatief.

Bij chronische blootstellingen baseert men zich gewoonlijk op de verwachte praktijksituatie in de industrie, in welk geval de dieren vijf dagen per week gedurende zes uur na het bereiken van de juiste concentratie in de blootstellingskamer worden blootgesteld (onderbroken blootstelling), of op een mogelijke blootstelling in het milieu, in welk geval de dieren zeven dagen per week gedurende 22 tot 24 uur per dag worden blootgesteld (continue expositie), met ongeveer een uur voor het voeren van de dieren (iedere dag op dezelfde tijd) en het schoonmaken van de kamer. In beide gevallen worden de dieren gewoonlijk blootgesteld aan een vaste concentratie van teststoffen. Een belangrijk verschil tussen onderbroken en continue expositie is dat er bij de eerste een periode van zeventien tot achttien uur is, waarin de dieren zich van de effecten van elke dagelijkse expositie kunnen herstellen; gedurende de weekeinden is deze herstelperiode nog langer.

De keuze tussen onderbroken of continue blootstelling hangt af van de doeleinden van het onderzoek en van de na te bootsen situatie bij de mens. Bepaalde technische moeilijkheden verdienen echter de aandacht. Zo kunnen bijvoorbeeld de voordelen van continue expositie voor het simuleren van de milieucondities wegvallen in verband met de noodzaak de dieren tijdens de blootstelling te eten en te drinken te geven, en de behoefte aan meer gecompliceerde (en betrouwbaardere) aerosol- en gasgeneratietechnieken en meettechnieken.

### Blootstellingskamers

De dieren worden aan de teststoffen blootgesteld in inhalatiekamers die zodanig gebouwd moeten zijn dat kan worden gezorgd voor een dynamische luchtdoorstroming van ten minste twaalf luchtverversingen per uur, een toereikend zuurstofgehalte en een gelijkmatige verdeling van de teststof in de atmosfeer. De controle- en blootstellingskamers dienen qua structuur identiek te zijn, zodat, behalve waar het de blootstelling aan de teststoffen aangaat, in alle opzichten vergelijkbare blootstellingsomstandigheden gewaarborgd zijn. Binnen de kamer wordt over het algemeen een geringe onderdruk gehandhaafd om te voorkomen dat de teststof naar buiten lekt. De kamers dienen zodanig te zijn ontworpen dat de dieren elkaar zo min mogelijk verdringen. Als algemene regel voor het verzekeren van een stabiele atmosfeer in de blootstellingskamer geldt dat het totale volume van de proefdieren niet meer mag bedragen dan 5% van het volume van de kamer.

De volgende parameters moeten worden gemeten of gecontroleerd:

- i) Luchtdoorstroming: het aantal verversingen per uur in de kamer dient bij voorkeur continu te worden gemeten.
- ii) Tijdens de dagelijkse blootstelling mag de concentratie niet meer dan  $\pm 15\%$  van het gemiddelde afwijken. Tijdens de gehele duur van de studie moeten de dagelijkse concentraties zo constant mogelijk worden gehouden.
- iii) Temperatuur en vochtigheid: voor knaagdieren moet de temperatuur op  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) en de vochtigheid in de kamer op 30 tot 70% worden gehouden, behalve wanneer water wordt gebruikt om de teststof in de atmosfeer van de expositiekamer te verstuiven. Beide waarden dienen bij voorkeur continu te worden gemeten.
- iv) Metingen van de deeltjesgrootte: wanneer de atmosfeer vloeibare of vaste aerosolen bevat, moet de verdeling van de deeltjesgrootte worden bepaald. De aerosoldeeltjes dienen een zodanige afmeting te hebben dat zij voor de gebruikte proefdieren in te ademen zijn. Monsters van de atmosfeer in de kamer dienen te worden genomen op ademhalingshoogte van de dieren. Het luchtmonster dient representatief te zijn voor de verdeling van de deeltjes waaraan de dieren zijn blootgesteld en dient, op gravimetrische basis, alle aerosoldeeltjes te bevatten, zelfs wanneer een groot gedeelte daarvan niet in te ademen is. Gedurende de werking van de apparatuur voor de verstuiving van de aerosoldeeltjes moeten regelmatig analyses worden uitgevoerd van de deeltjesgrootte, ten einde de stabiliteit van het aerosol na te gaan, en daarna tijdens de blootstelling zo vaak als nodig is om de stabiliteit van de verdeling van de deeltjesgrootte waaraan de dieren zijn blootgesteld, te bepalen.

#### Duur van het onderzoek

De toedieningsperiode dient ten minste twaalf maanden te bedragen.

#### *Uitvoering*

##### Waarnemingen

Ten minste éénmaal per dag dient een zorgvuldig klinisch onderzoek te worden verricht. Iedere dag moeten aanvullende waarnemingen worden gedaan, waarbij ervoor moet worden gezorgd dat er zo weinig mogelijk dieren voor het onderzoek verloren gaan, bijvoorbeeld door necropsie te verrichten op dood aangetroffen dieren of deze gekoeld te bewaren en afzondering of opoffering van zwakke of stervende dieren. Er moeten zorgvuldige waarnemingen worden gedaan, ten einde het optreden en ontwikkelen van alle toxische effecten te ontdekken en ervoor te zorgen dat er zo min mogelijk dieren verloren gaan als gevolg van ziekte, autolyse of kannibalisme.

Klinische tekenen, waaronder ook neurologische en oculaire veranderingen en sterfte, moeten voor alle dieren worden vastgesteld. Het tijdstip waarop de toxische verschijnselen, met inbegrip van verdachte tumoren, voor het eerst optreden, en de ontwikkeling ervan, dienen te worden vastgelegd.

Gedurende de eerste dertien weken van het onderzoek dient het lichaamsgewicht van elk dier afzonderlijk eenmaal per week te worden vastgelegd; daarna ten minste om de vier weken. Gedurende de eerste dertien weken van het onderzoek dient het verbruik van voer wekelijks te worden bepaald; daarna om de drie maanden, tenzij wijzigingen in de gezondheidstoestand of het lichaamsgewicht van het dier anders voorschrijven.

##### Hematologisch onderzoek

Een hematologisch onderzoek (bij voorbeeld hemoglobinegehalte, hematocriet, totaal aantal rode bloedlichaampjes, totaal aantal witte bloedlichaampjes, bloedplaatjes of andere metingen van de stollingseigenschappen) dient te worden verricht na drie maanden, zes maanden en vervolgens om de zes maanden en aan het einde van het onderzoek op bloedmonsters van alle niet-knaagdieren en van tien ratten per geslacht uit alle groepen. Indien mogelijk dienen deze monsters telkens afkomstig te zijn van dezelfde ratten. Bij niet-knaagdieren dient bovendien vóór de test een monster te worden genomen.

Indien op grond van klinische waarnemingen wordt vermoed dat de gezondheidstoestand van de dieren tijdens het onderzoek achteruitgaat, dient bij de betrokken dieren een differentiele telling van bloedcellen te worden uitgevoerd.

Een differentiele telling van bloedcellen wordt uitgevoerd op monsters afkomstig van de dieren in de hoogste dosisgroep en de controlegroep. Bij de daaropvolgende lagere groep(en) worden alleen differentiele tellingen van bloedcellen verricht als er tussen de hoogste groep en de controlegroepen een groot verschil bestaat of als daartoe op grond van het pathologisch onderzoek een indicatie wordt gegeven.

##### Urineonderzoek

Van alle niet-knaagdieren en van tien ratten per geslacht uit alle groepen, indien mogelijk van dezelfde ratten en met dezelfde tussenpozen als bij het bloedonderzoek, moeten met het oog op een analyse urinemonsters worden genomen. In het geval van knaagdieren dienen bij de afzonderlijke dieren of op een samengevoegd monster per geslacht per groep de volgende bepalingen te worden verricht:

— uiterlijk: volume en dichtheid voor de afzonderlijke dieren;

- eiwit, glucose, ketonen, occult bloed (semi-kwantitatief);
- en
- microscopie van sediment (semi-kwantitatief).

### Klinische biochemie

Ongeveer om de zes maanden en aan het einde van het onderzoek worden bloedmonsters voor klinisch-biochemische metingen genomen bij alle niet-knaagdieren en bij tien ratten per geslacht uit alle groepen, indien mogelijk steeds bij dezelfde ratten. Bij niet-knaagdieren dient bovendien voor het onderzoek een monster te worden genomen. Uit deze monsters wordt het plasma bereid, waarop de volgende bepalingen worden verricht:

- totaal eiwitgehalte;
- albuminegehalte;
- leverfunctietesten (zoals alkalische fosfataseactiviteit, glutamaatpyruvaattransaminase<sup>(1)</sup>activiteit en glutamaatoxaalacetaattransaminase<sup>(2)</sup>activiteit), gammaglutamyltranspeptidase, ornithinedecarboxylase;
- koolhydraatstofwisseling, zoals nuchter glucosegehalte van het bloed;
- nierfunctietesten zoals ureumstikstof in het bloed.

### Macroscopische necropsie

Op alle dieren, ook die welke tijdens het experiment stierven of gedood werden toen zij stervende waren, moet een volledig macroscopisch onderzoek worden verricht. Van alle dieren moeten, voordat zij gedood worden, bloedmonsters worden genomen voor differentieële tellingen van bloedcellen. Alle met het blote oog zichtbare letsels, tumoren of letsels waarvan wordt aangenomen dat het tumoren zijn, dienen te worden bewaard. Getracht moet worden om de macroscopische waarnemingen te correleren aan de microscopische bevindingen.

Alle organen en weefsels dienen voor microscopisch onderzoek te worden bewaard. Gewoonlijk zijn dat de volgende organen en weefsels: hersenen <sup>(3)</sup> (medulla/pons, cortex cerebelli, cortex cerebri), hypofyse, schildklier (met bijschildklieren), thymus, longen (met luchtpijp), hart, aorta, speekselklieren, lever <sup>(3)</sup>, milt, nieren, bijniere, slokdarm, maag, duodenum, jejunum, ileum, blinde darm, colon, rectum, uterus, urineblaas, lymfklieren, alvleesklier, geslachtsklieren <sup>(3)</sup>, secundaire geslachtsorganen, vrouwelijke borstklier, huid, spieren, perifere zenuwen, ruggemerg (cervicaal, thoracaal, lumbaal), borstbeen met beenmerg, dijbeen (met gewricht) en ogen. Vullen van de longen en urineblaas met een fixatief is de beste manier om deze weefsels te bewaren. Bij inhalatiestudies is het vullen van de longen van wezenlijk belang voor een goed histopathologisch onderzoek. Bij speciale studies zoals inhalatiestudies dient de gehele tractus respiratorius te worden onderzocht, inclusief neus, pharynx en larynx.

Indien nog ander klinisch onderzoek wordt verricht, dient de daaruit verkregen informatie vóór het microscopisch onderzoek beschikbaar te zijn, omdat dit voor de patholoog belangrijke aanwijzingen kan bevatten.

### Histopathologie

Alle zichtbare veranderingen, in het bijzonder tumoren en andere letsels in enig orgaan, dienen microscopisch te worden onderzocht. Daarnaast verdient het aanbeveling nog de volgende onderzoeken te verrichten:

- a) Microscopisch onderzoek van alle bewaarde organen en weefsels met een volledige beschrijving van alle geconstateerde letsels bij:
  1. alle dieren die tijdens het onderzoek stierven of werden gedood;
  2. alle dieren uit de groep met de hoogste dosis en de controlegroepen.
- b) Organen en weefsels die afwijkingen vertonen die veroorzaakt (kunnen) zijn door de teststof, worden ook bij de lagere dosisgroepen onderzocht.
- c) Mocht uit het experiment blijken dat de normale levensduur van de dieren aanzienlijk wordt verkort of dat er effecten geïnduceerd worden die een toxische reactie zouden kunnen beïnvloeden, dan moet de eerstvolgende lagere dosisgroep worden onderzocht zoals hierboven beschreven.
- d) Voor een juiste beoordeling van de betekenis van de bij de blootgestelde dieren waargenomen veranderingen is bekendheid met het voorkomen van letsels die bij de gebruikte dierstam gewoonlijk voorkomen (onder dezelfde laboratoriumomstandigheden, dat wil zeggen controlegegevens uit het verleden) onontbeerlijk.

<sup>(1)</sup> Thans bekend als serumalanineaminotransferase.

<sup>(2)</sup> Thans bekend als serumspartaaminotransferase.

<sup>(3)</sup> Deze organen, afkomstig van tien dieren per geslacht per groep voor knaagdieren en van alle niet-knaagdieren, alsmede de schildklier (met bijschildklieren) voor alle niet-knaagdieren, dienen te worden gewogen.

## 2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het aantal dieren dat letsels vertoont, en het percentage dieren waarbij ieder type letsel voorkomt. De resultaten moeten met behulp van een voor dit doel geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

## 3. VERSLAGGEVING

### 3.1. Verslag van de proefnemingen

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voer, enzovoort;
- proefomstandigheden:
  - Beschrijving van de blootstellingsapparatuur:  
Met inbegrip van ontwerp, type, afmetingen, luchtbron, systeem voor het bereiden van stof- en vloeistof-aërosolen, methode voor het conditioneren van de lucht, behandeling van de afgewerkte lucht en wijze waarop de dieren tijdens de proeven in een blootstellingskamer zijn ondergebracht als deze wordt gebruikt. Er moet een beschrijving worden gegeven van de apparatuur voor het meten van de temperatuur, de vochtigheid en, in voorkomend geval, de stabiliteit van de concentratie en de deeltjesgrootte van de aërosolen.
  - Gegevens betreffende de blootstelling:  
Deze moeten in tabelvorm worden gerangschikt en voorzien worden van gemiddelde waarden en een maat voor de variabiliteit (bij voorbeeld standaarddeviatie). Ze dienen te omvatten:
    - a) het aantal luchtverversingen per uur in de inhalatieapparatuur;
    - b) temperatuur en vochtigheid van de lucht;
    - c) nominale concentraties (de totale hoeveelheid teststof die de inhalatieapparatuur wordt binnengeleid, gedeeld door het luchtvolume);
    - d) aard van het eventuele medium;
    - e) feitelijke concentraties van de teststof in het ademhalingsgebied van de dieren;
    - f) mediaan van de deeltjesgrootte (in voorkomend geval).
- dosisniveaus (met het eventuele medium) en concentraties;
- gegevens over de toxische reactie naar geslacht en dosis;
- dosis- of concentratieniveau waarop geen effect is waargenomen;
- tijdstip gedurende het onderzoek waarop de dood intreedt of aangeven of dieren tot het einde van de proef in leven bleven;
- beschrijving van toxische of andere effecten;
- tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en verloop hiervan;
- gegevens over voer en lichaamsgewicht;
- oftalmologische bevindingen;
- uitgevoerd hematologisch onderzoek en alle resultaten;
- uitgevoerd klinisch-biochemisch onderzoek en alle resultaten (met inbegrip van resultaten van het urineonderzoek);
- bevindingen van de necropsie;
- gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
- statistische verwerking van de resultaten, waar dat mogelijk is;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

### 3.2. Evaluatie en interpretatie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

## 4. LITERATUUR

Zie Algemene inleiding — Deel B.

## B.31 TERATOGENITEITSONDERZOEK

### 1. METHODE

#### 1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

#### 1.2. Definities

Zie Algemene inleiding — Deel B.

#### 1.3. Referentiestoffen

Geen.

#### 1.4. Principe van de onderzoekmethode

De teststof wordt in geleidelijk stijgende doseringen of concentraties aan verscheidene groepen drachtige proefdieren toegediend gedurende ten minste dat deel van de dracht waarin de organogenese plaatsvindt. Er wordt een dosis per groep gebruikt. Kort voor de vermoedelijke werpdatum wordt het moederdier gedood, de baarmoeder verwijderd en de inhoud ervan onderzocht. Deze onderzoekmethode heeft betrekking op de embryonen foetotoxiciteit.

#### 1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

#### 1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

##### *Vorbereidingen*

Voor het onderzoek worden gezonde, jonge, volwassen en nog niet eerder gedekte wijfjes van vergelijkbare leeftijd en grootte gedurende ten minste vijf dagen aan de laboratoriumomstandigheden gewend, waarna men ze laat paren met mannetjes waarvan vaststaat dat zij vruchtbaar zijn. Na inseminatie worden de dieren op willekeurige wijze in de te behandelen groepen ingedeeld. De bevruchting kan geschieden via paring of kunstmatige inseminatie. Kort na de implantatie en gedurende de hele periode van organogenese wordt de teststof dagelijks aan de vrouwtjes toegediend. Daags voor de worp worden de foetussen door middel van hysterectomie verlost en onderzocht op viscerale en skeletafwijkingen, met inbegrip van groeivertraging, vertraagde beenvorming en intestinale bloedingen.

##### *Proefomstandigheden*

##### *Proefdieren*

De gewoonlijk gebruikte diersoorten zijn de rat, de muis, de hamster en het konijn. Rat en konijn verdienen de voorkeur. Er dient gebruik te worden gemaakt van gewoonlijk in laboratoria gebruikte stammen. De vruchtbaarheid van de stam mag niet te laag zijn en de stam moet voor wat betreft de reactie op teratogenen gekarakteriseerd zijn. De dieren moeten apart in kooien worden ondergebracht.

##### *Aantal en geslacht*

Voor ieder dosisniveau zijn ten minste twintig drachtige ratten, muizen of hamsters, dan wel twaalf drachtige konijnen vereist. Dit om ervoor te zorgen dat er voldoende worpen en jongen zijn om de teratogene eigenschappen van de stof te kunnen beoordelen.

##### *Dosisniveaus*

Er dienen ten minste drie dosisgroepen en een controlegroep te worden gebruikt. Wanneer de teststof in een medium wordt toegediend, is ook een mediumcontrolegroep vereist. Wordt van een medium gebruik gemaakt, dan moeten de toxicologische eigenschappen ervan bekend zijn; het mag niet teratogeen zijn en ook geen effecten op de reproductie hebben. Afgezien van de toediening van de teststof moeten de dieren in de controlegroep(en) op

dezelfde wijze worden behandeld als de dieren in de proefgroep. Tenzij de fysisch/chemische of biologische eigenschappen van de stof dat niet toelaten, moet het hoogste dosisniveau in het ideale geval leiden tot enige duidelijk zichtbare tekenen van toxiciteit bij het moederdier, zoals een gering gewichtsverlies, maar het aantal sterfgevallen onder de moederdieren mag niet meer dan 10% bedragen. Bij het laagste dosisniveau mogen geen waarneembare, aan de teststof toe te schrijven effecten optreden. De tussliggende doses moeten geometrisch tussen het hoge en lage dosisniveau worden verdeeld.

#### Hoogste te testen dosis

Als er in het geval van stoffen met een lage toxiciteit bij een dosisniveau van ten minste 1 000 mg/kg geen tekenen van embryotoxiciteit of teratogeniteit optreden, zijn proeven met andere dosisniveaus wellicht niet noodzakelijk. Als er bij een dosis van minder dan 1 000 mg/kg duidelijke tekenen van toxiciteit bij het moederdier (zoals hierboven omschreven) optreden, maar geen nadelige effecten op het embryo, zijn proeven met andere dosisniveaus wellicht niet noodzakelijk.

#### Blootstellingsduur

Dag 0 bij de proef is de dag waarop een vaginale plug en/of sperma wordt waargenomen (waar mogelijk). De doseringsperiode moet samenvallen met de periode van organogenese. Voor de rat en de muis is dat de zesde tot en met de vijftiende dag, voor de hamster de zesde tot en met de veertiende en voor het konijn de zesde tot en met de achttiende. Indien als dag 0 de dag van paring of kunstmatige inseminatie wordt aangehouden, moet bij de vermelde tijden een dag worden opgeteld. Een andere methode is, de dosering tot ongeveer één dag voor de vermoedelijke werpdatum voort te zetten.

#### Observatieperiode

Ten minste eenmaal per dag dient een zorgvuldig klinisch onderzoek te worden verricht. Daarnaast dienen dagelijks waarnemingen te worden verricht en de nodige maatregelen te worden genomen om ervoor te zorgen dat zo min mogelijk dieren voor de studie verloren gaan.

#### Uitvoering

De teststof wordt oraal via een maagsonde toegediend. De teststof moet elke dag op ongeveer hetzelfde tijdstip worden toegediend.

De vrouwelijke proefdieren worden gedurende de toepasselijke behandelingsperiode dagelijks met de teststof behandeld. Voor de bepaling van de dosis kan worden uitgegaan van het gewicht van de wijfjes bij het begin van de toediening van de stof; ook kunnen de dieren, gezien de snelle gewichtstoename tijdens de dracht, op gezette tijden worden gewogen en kan de dosering worden gebaseerd op het laatst vastgestelde gewicht. Tekenen van toxiciteit moeten, zodra zij worden waargenomen, samen met het tijdstip waarop deze voor het eerst zijn opgetreden, de mate en de duur van de toxiciteit worden vastgelegd. Wijfjes die tekenen van abortus of partus praematurus vertonen, moeten worden gedood en aan een grondig macroscopisch onderzoek worden onderworpen. De dieren moeten na de behandeling worden geobserveerd tot ongeveer een dag voor de worp; zo wordt het grootste deel van de drachttijd bestreken, maar worden complicaties bij de interpretatie van de resultaten, die zich als gevolg van een natuurlijke geboorte zouden kunnen voordoen, vermeden. Bij het observeren van de dieren in de kooien moet onder meer aandacht worden besteed aan veranderingen in huid en vacht, ogen en slijmvliezen, ademhaling, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag. Het verbruik van voer moet wekelijks worden gemeten; de dieren moeten wekelijks worden gewogen.

#### Necropsie

Als het moederdier tijdens of aan het einde van het onderzoek sterft, moet het macroscopisch worden onderzocht op eventuele structurele afwijkingen of pathologische veranderingen die van invloed kunnen zijn geweest op de dracht. Onmiddellijk na de dood dient de uterus te worden verwijderd en de inhoud ervan te worden onderzocht op dode embryo's of foetussen en het aantal levende foetussen. Doorgaans is het mogelijk de tijd waarop de dood in utero is ingetreden, te schatten. Bij ratten en konijnen kan het aantal corpora lutea worden bepaald. Het geslacht van de foetussen moet worden bepaald en zij moeten afzonderlijk worden gewogen, waarna de gewichten worden opgetekend zodat daaruit het gemiddelde foetale gewicht kan worden afgeleid. Na verwijdering dient elke foetus uitwendig te worden onderzocht. Bij ratten, muizen en hamsters moet een derde tot de helft van elke worp worden geprepareerd en onderzocht op skeletafwijkingen, terwijl het resterende gedeelte van elke worp moet worden geprepareerd en onderzocht op afwijkingen aan de zachte weefsels, een en ander met gebruikmaking van de voor dat doel geschikte methoden. Bij konijnen moet elke foetus door middel van zorgvuldige sectie worden onderzocht op viscerale afwijkingen en vervolgens op skeletafwijkingen.

2.

#### GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het aantal dat drachtig werd, het aantal en de percentages levende foetussen en foetussen met afwijkingen aan de zachte weefsels of het skelet, en de relatie daarvan tot het nest waaruit zij komen. De resultaten moeten met behulp van een voor dit doel geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere algemeen erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

### 3. VERSLAGGEVING

#### 3.1. Verslag van de proefnemingen

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voer, enzovoort;
- proefomstandigheden;
- dosisniveaus (met het eventuele medium) en concentraties;
- gegevens over de toxische reactie naar dosis;
- waar mogelijk, het dosisniveau waarop geen effect is waargenomen;
- tijdstip gedurende de studie waarop de dood intreedt of aangeven of dieren tot het einde van de proef in leven bleven;
- beschrijving van toxische of andere effecten;
- tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en verloop hiervan;
- gegevens over voer en lichaamsgewicht;
- duur van de dracht en gegevens over de worp (gegevens uit het verleden inbegrepen);
- gegevens over de foetussen (levend/dood, geslacht, afwijkingen aan de zachte weefsels en het skelet);
- gegevens over de worp (levend/dood, geslacht, voor elke worp afwijkingen aan de zachte weefsels en het skelet);
- statistische verwerking van de resultaten;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

#### 3.2. Evaluatie en interpretatie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

### 4. LITERATUUR

Zie Algemene inleiding — Deel B.

---

1. **METHODE**

1.1. **Inleiding**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. **Definities**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. **Referentiestoffen**

Geen.

1.4. **Principe van de onderzoekmethode**

De teststof wordt normaal gesproken zeven dagen per week langs een geschikte weg aan verscheidene groepen proefdieren gedurende een groot deel van hun levensduur toegediend. Er wordt een dosis per groep gebruikt. Tijdens en na de blootstelling aan de teststof worden de proefdieren dagelijks op tekenen van toxiciteit onderzocht, met name op zich ontwikkelende tumoren.

1.5. **Kwaliteitscriteria**

Geen.

1.6. **Beschrijving van de onderzoekmethode**

Voor het onderzoek worden de dieren ten minste vijf dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Voor het onderzoek worden gezonde, jonge dieren op willekeurige wijze in de te behandelen en controlegroepen ingedeeld.

**Proefdieren**

Er wordt de voorkeur gegeven aan ratten. Op grond van de resultaten van eerder uitgevoerd onderzoek mogen ook andere diersoorten (knaagdieren of niet-knaagdieren) worden gebruikt. Er dient gebruik te worden gemaakt van stammen van jonge, gezonde dieren die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt en met de dosering dient zo spoedig mogelijk na het spenen te worden begonnen.

Bij het begin van het onderzoek mag het gewicht van de dieren niet meer dan  $\pm 20\%$  van het gemiddelde gewicht afwijken. Indien een studie naar de subchronische orale toxiciteit is uitgevoerd ter voorbereiding op een chronisch toxiciteitsonderzoek, dienen in beide studies dezelfde soort en stam te worden gebruikt.

**Aantal en geslacht**

Voor ieder dosisniveau en de parallelle controlegroep moeten ten minste 100 dieren (50 wijfjes en 50 mannetjes) worden gebruikt. De wijfjes moeten nulliparae zijn en mogen niet drachtig zijn. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal worden verhoogd met het aantal dieren dat volgens plan voor de voltooiing van de studie zal worden gedood.

**Dosisniveaus en frequentie van blootstelling**

Naast de parallelle controlegroep dienen ten minste drie dosisniveaus te worden gebruikt. Het hoogste dosisniveau moet leiden tot tekenen van minimale toxiciteit, zoals een lichte achteruitgang van de gewichtstoename (minder dan 10%), zonder dat daardoor de normale levensduur als gevolg van andere effecten dan tumoren aanzienlijk wordt verkort.

Bij de laagste dosis mogen de normale groei, ontwikkeling en levensduur van het dier niet worden verstoord en mogen geen tekenen van toxiciteit optreden. In het algemeen dient deze dosis niet lager te zijn dan 10% van de hoogste dosis.



De tussenliggende doses moeten worden gekozen in een gebied halverwege tussen de hoge en de lage dosis.

Bij de keuze van de dosisniveaus dient rekening te worden gehouden met de gegevens uit eerder uitgevoerd toxiciteitsonderzoek.

De frequentie van de blootstelling is normaliter dagelijks. Indien de teststof in het drinkwater wordt toegediend of met het voer wordt gemengd, dient dit steeds beschikbaar te zijn.

### Controlegroepen

Er dient gebruik te worden gemaakt van een parallelle controlegroep die, afgezien van de blootstelling aan de teststof, in elk opzicht identiek is aan de behandelde groepen.

In speciale omstandigheden, zoals bij inhalatiestudies met aërosolen of bij gebruik van een emulgator met onbekende biologische activiteit via de orale weg, dient ook van een extra controlegroep gebruik te worden gemaakt, waarbij het medium wordt weggelaten.

### Toedieningsweg

De drie belangrijkste toedieningswegen zijn de orale, de dermale en de inhalatieweg. De keuze van de toedieningsweg hangt af van de fysische en chemische eigenschappen van de teststof en de meest waarschijnlijke blootstellingsroute bij de mens.

#### Orale studies

Indien de teststof in het maag-darmkanaal wordt geresorbeerd en de blootstelling van de mens onder meer langs de orale weg geschiedt, verdient orale toediening de voorkeur, tenzij er contra-indicaties zijn. De dieren moeten de teststof toegediend krijgen in hun voedsel, opgelost in het drinkwater of in capsules.

In het ideale geval dient de dosis zeven dagen per week dagelijks te worden toegediend, omdat bij dosering gedurende vijf dagen per week het dier zich in de tijd dat geen dosis wordt toegediend eventueel herstelt of de toxiciteitsverschijnselen verdwijnen, waardoor de resultaten en de evaluatie daarvan kunnen worden beïnvloed. Voornamelijk uit praktische overwegingen echter wordt dosering gedurende vijf dagen per week aanvaardbaar geacht.

#### Dermale studies

Dermale blootstelling door het aanbrengen van de teststof op de huid kan worden gekozen om een belangrijke blootstellingsweg bij de mens te simuleren en als model voor de inductie van huidletsels.

#### Inhalatiestudies

Aangezien bij inhalatiestudies de technische problemen ingewikkelder zijn dan bij andere toedieningswegen het geval is, volgen hieronder meer gedetailleerde aanwijzingen met betrekking op deze wijze van toediening. In specifieke omstandigheden is intratracheale instillatie wellicht een deugdelijk alternatief.

Bij chronische blootstellingen baseert men zich gewoonlijk op de verwachte praktijksituatie in de industrie, in welk geval de dieren vijf dagen per week gedurende zes uur na het bereiken van de juiste concentratie in de blootstellingskamer worden blootgesteld (onderbroken blootstelling), of op een mogelijke blootstelling in het milieu, in welk geval de dieren zeven dagen per week gedurende 22 tot 24 uur per dag worden blootgesteld (continue blootstelling), met ongeveer een uur voor het voederen van de dieren (iedere dag op dezelfde tijd) en het schoonmaken van de kamer. In beide gevallen worden de dieren doorgaans blootgesteld aan een vaste concentratie van teststoffen. Een belangrijk verschil tussen onderbroken en continue blootstelling is dat er bij de eerste een periode van zeventien tot achttien uur is waarin de dieren zich van de effecten van elke dagelijkse blootstelling kunnen herstellen; gedurende de weekeinden is deze herstelperiode nog langer.

De keuze tussen onderbroken of continue blootstelling hangt af van de doeleinden van het onderzoek en van de na te bootsen omstandigheden bij de mens. Bepaalde technische moeilijkheden verdienen echter de aandacht. Zo kunnen bij voorbeeld de voordelen van continue blootstelling voor het nabootsen van de milieucondities wegvallen in verband met de noodzaak de dieren tijdens de blootstelling te eten en te drinken te geven, en de behoefte aan meer gecompliceerde en betrouwbare aërosol- en gasgeneratietechnieken en meettechnieken.

### Blootstellingskamers

De dieren worden aan de teststoffen blootgesteld in inhalatiekamers die zodanig gebouwd moeten zijn dat kan worden gezorgd voor een dynamische luchtdoorstroming van ten minste twaalf luchtverversingen per uur, een toereikend zuurstofgehalte en een gelijkmatige verdeling van de teststof in de atmosfeer. De controle- en blootstellingskamers moeten qua structuur identiek zijn, zodat, behalve waar het de blootstelling aan de teststoffen betreft, in alle opzichten vergelijkbare blootstellingsomstandigheden gewaarborgd zijn. Binnen de kamer wordt

over het algemeen een geringe onderdruk gehandhaafd om te voorkomen dat de teststof naar buiten lekt. De blootstellingskamers moeten zodanig zijn ontworpen dat de dieren elkaar zo min mogelijk verdringen. Als algemene regel voor het verzekeren van een stabiele atmosfeer in de blootstellingskamer geldt dat het totale volume van de proefdieren niet meer mag bedragen dan 5% van het volume van de kamer.

De volgende parameters moeten worden gemeten of gecontroleerd:

- i) Luchtdoorstroming: het aantal luchtverversingen per uur in de kamer dient bij voorkeur continu te worden gemeten.
- ii) Tijdens de dagelijkse blootstelling mag de concentratie niet meer dan  $\pm 15\%$  van het gemiddelde afwijken. Tijdens de gehele duur van de studie moeten de dagelijkse concentraties zo constant mogelijk worden gehouden.
- iii) Temperatuur en vochtigheid: voor knaagdieren dient de temperatuur op  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) en de vochtigheid in de kamer op 30 tot 70% te worden gehouden, behalve wanneer water wordt gebruikt om de teststof in de atmosfeer van de blootstellingskamer te verstuiven. Beide waarden dienen bij voorkeur continu te worden gemeten.
- iv) Metingen van de deeltjesgrootte: wanneer de atmosfeer vloeibare of vaste aerosolen bevat, dient de verdeling van de deeltjesgrootte te worden bepaald. De aerosoldeeltjes dienen een zodanige afmeting te hebben dat zij voor de gebruikte proefdieren in te ademen zijn. Monsters van de atmosfeer in de kamer dienen te worden genomen op ademhalingshoogte van de dieren. Het luchtmonster dient representatief te zijn voor de verdeling van de deeltjes waaraan de dieren zijn blootgesteld en dient, op gravimetrische basis, alle aerosoldeeltjes te bevatten, zelfs wanneer een groot gedeelte daarvan niet in te ademen is. Gedurende de werking van de apparatuur voor het verstuiven van deeltjes moeten regelmatig analyses worden uitgevoerd van de deeltjesgrootte, ten einde de stabiliteit van de aerosol na te gaan, en daarna tijdens de blootstelling zo vaak als nodig is om de stabiliteit van de verdeling van de deeltjesgrootte waaraan de dieren zijn blootgesteld te bepalen.

#### Duur van het onderzoek

Een carcinogeniteitstest beslaat het grootste deel van de normale levensduur van de proefdieren. Bij muizen en hamsters dient het onderzoek na achttien maanden te worden beëindigd, bij ratten na 24 maanden; voor bepaalde diersoorten met een langere levensduur en/of een laag percentage spontane tumoren dient de studie te worden beëindigd na 24 maanden bij muizen en hamsters en na 30 maanden bij ratten. Een dergelijk uitgebreid onderzoek kan echter worden beëindigd wanneer het aantal overlevende dieren in de groep met de laagste dosis of in de controlegroep 25% bedraagt. Indien blijkt dat de geslachten duidelijk verschillend reageren, dienen de geslachten afzonderlijk te worden beschouwd. Als alleen dieren in de groep met de hoogste dosis vroegtijdig sterven en dit duidelijk aan toxiciteit te wijten is, betekent dit niet dat het onderzoek moet worden beëindigd, mits de toxische verschijnselen bij de andere groepen geen problemen veroorzaken. Wil een negatief testresultaat aanvaardbaar zijn, dan mag niet meer dan 10% van een groep voor het experiment verloren gaan als gevolg van autolyse, kannibalisme of huisvestingsproblemen, en moet het percentage overlevende dieren in alle groepen na achttien maanden voor muizen en hamsters en na 24 maanden voor ratten ten minste 50% bedragen.

#### Uitvoering

##### Waarnemingen

De dieren moeten dagelijks in de kooien worden geobserveerd. Daarbij moet aandacht worden besteed aan veranderingen in huid en vacht, ogen en slijmvliezen, alsmede ademhaling, bloedsomloop, het autonome en centrale zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag.

De dieren moeten regelmatig worden geobserveerd om te voorkomen dat zij voor de studie verloren gaan als gevolg van oorzaken als kannibalisme, autolyse van weefsels of het op verkeerde wijze in de kooien stoppen. Indien stervende dieren worden aangetroffen, moeten zij worden verwijderd; op hen wordt necropsie verricht.

Voor alle dieren dienen de klinische tekenen en sterfte te worden vastgelegd. Bijzondere aandacht moet worden besteed aan zich ontwikkelende tumoren; van elke met het blote oog zichtbare of voelbare tumor moeten het tijdstip waarop deze voor het eerst is opgetreden, de plaats, de afmetingen, het uiterlijk en het verloop worden opgetekend.

Gedurende de eerste dertien weken van het onderzoek dient het verbruik van voer (en water wanneer de teststof in het drinkwater wordt toegediend) wekelijks te worden gemeten; daarna ongeveer om de drie maanden, tenzij wijzigingen in de gezondheidstoestand of het lichaamsgewicht van het dier anders voorschrijven.

Gedurende de eerste dertien weken van het onderzoek dient het lichaamsgewicht voor elk dier afzonderlijk eens per week te worden vastgelegd; daarna ten minste om de vier weken.

## Hematologie

Als op grond van de observatie van de dieren in de kooien wordt vermoed dat de gezondheidstoestand van de dieren tijdens het onderzoek achteruit gaat, dient bij de betrokken dieren een differentieële telling van bloedcellen te worden uitgevoerd.

Na twaalf maanden, achttien maanden en voordat de dieren worden gedood, moet voor alle dieren een bloeditstrijk worden gemaakt. Er wordt een differentieële telling van bloedcellen verricht op monsters afkomstig van de dieren in de groep met de hoogste dosis en de controlegroepen. Als het op grond van deze gegevens, met name die welke zijn verkregen vóór het doden van de dieren, of de gegevens van het pathologisch onderzoek nodig mocht blijken, moeten ook differentieële tellingen van bloedcellen worden verricht voor de eerstvolgende lagere dosisgroep(en).

## Macroscopische necropsie

Op alle dieren, ook die welke tijdens het onderzoek stierven of werden gedood toen zij stervende waren, dient een volledige macroscopische necropsie te worden verricht. Alle met het blote oog zichtbare tumoren of letsels waarvan wordt aangenomen dat het tumoren zijn, dienen te worden bewaard.

De volgende organen en weefsels dienen in een geschikt medium voor eventueel later histopathologisch onderzoek te worden bewaard: alle met het blote oog zichtbare letsels, hersenen (met inbegrip van delen van medulla/pons, cortex cerebelli en cortex cerebri), hypofyse, schildklier/bijschildklieren, thymusweefsel, luchtpijp en longen, hart, aorta, speekselklieren, lever, milt, nieren, bijnieren, alvleesklier, geslachtsklieren, uterus, secundaire geslachtsorganen, huid, slokdarm, maag, duodenum, jejunum, ileum, blinde darm, colon, rectum, urineblaas, representatieve lymfklieren, vrouwelijke borstklier, dijbeenspieren, perifere zenuwen, borstbeen met beenmerg, dijbeen (met inbegrip van gewrichtsvlak), ruggemerg op drie plaatsen (cervicaal, mediothoracaal en lumbaal) en ogen.

Vullen van de longen en urineblaas met een fixatief is de beste manier om deze weefsels te bewaren. Bij inhalatiestudies is het vullen van de longen een eerste vereiste voor een goed histopathologisch onderzoek. Bij inhalatiestudies dient de gehele tractus respiratorius te worden bewaard, inclusief neusholte, pharynx en larynx.

## Histopathologie

- a) Er dient een volledig histopathologisch onderzoek te worden verricht op de organen en weefsels van alle dieren die sterven of tijdens het onderzoek worden gedood en alle dieren in de controlegroep en de groep met de hoge dosis.
- b) Verder dienen alle met het blote oog zichtbare tumoren of letsels waarvan wordt vermoed dat het tumoren zijn, bij alle groepen histopathologisch te worden onderzocht.
- c) Indien er een aanzienlijk verschil bestaat in de incidentie van neoplastische letsels tussen de groep met de hoogste dosis en de controlegroep, dient een histopathologisch onderzoek te worden uitgevoerd op het bewuste orgaan of weefsel bij de andere dosisgroepen.
- d) Als het aantal overlevende dieren in de groep met de hoogste dosis aanmerkelijk kleiner is dan in de controlegroep, moet de eerstvolgende lagere dosisgroep volledig worden onderzocht.
- e) Indien bij de hoogste dosisgroep blijkt dat er toxische of andere effecten geïnduceerd werden die van invloed zouden kunnen zijn op de neoplastische respons, dient de eerstvolgende lagere dosisgroep volledig te worden onderzocht.

## 2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het aantal dieren waarbij tijdens het onderzoek tumoren zijn ontdekt, het tijdstip waarop deze zijn ontdekt, en het aantal dieren dat, na te zijn gedood, tumoren blijkt te hebben. De resultaten moeten met behulp van een voor dit doel geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

## 3. VERSLAGGEVING

### 3.1. Verslag van de proefnemingen

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voer, enzovoort;

— proefomstandigheden:

**Beschrijving van de blootstellingsapparatuur:**

Met inbegrip van ontwerp, type, afmetingen, luchtbron, systeem voor het bereiden van stof- en vloeistof-aërosolen, methode voor het conditioneren van de lucht, behandeling van de afgewerkte lucht en wijze waarop de dieren tijdens de proeven in een blootstellingskamer zijn ondergebracht als deze wordt gebruikt. Er moet een beschrijving worden gegeven van de apparatuur voor het meten van de temperatuur, de vochtigheid en, in voorkomend geval, de stabiliteit van de concentratie en de deeltjesgrootte van de aërosolen.

**Gegevens betreffende de blootstelling:**

Deze moeten in tabelvorm worden gerangschikt en worden voorzien van gemiddelde waarden en een maat voor de variabiliteit (bij voorbeeld standaarddeviatie). Ze dienen te omvatten:

- a) het aantal luchtverversingen per uur in de inhalatieapparatuur;
  - b) temperatuur en vochtigheid van de lucht;
  - c) nominale concentraties (de totale hoeveelheid teststof die de inhalatieapparatuur wordt binnengeleid, gedeeld door het luchtvolume);
  - d) aard van het eventuele medium;
  - e) feitelijke concentraties van de teststof in het ademhalingsgebied van de dieren;
  - f) mediaan van de deeltjesgrootte (in voorkomend geval);
- dosisniveaus (met het eventuele medium) en concentraties;
- gegevens over de tumorincidentie naar geslacht, dosis en type tumor;
- tijdstip gedurende het onderzoek waarop de dood intreedt of aangeven of dieren tot het eind van de proef in leven bleven;
- gegevens over de toxische reactie naar geslacht en dosis;
- beschrijving van toxische of andere effecten;
- tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en verloop hiervan;
- gegevens over voedsel en lichaamsgewicht;
- resultaten van hematologisch onderzoek;
- bevindingen van de necropsie;
- gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
- statistische verwerking van de resultaten met een beschrijving van de gebruikte methoden;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. **LITERATUUR**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

---

## B.33 GECOMBINEERDE CHRONISCHE TOXICITEIT/CARCINOGENITEITSTEST

### 1. METHODE

#### 1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

#### 1.2. Definities

Zie Algemene inleiding — Deel B.

#### 1.3. Referentiestoffen

Geen.

#### 1.4. Principe van de onderzoekmethode

Doel van een gecombineerd onderzoek naar de chronische toxiciteit en carcinogeniteit is, na langdurige en herhaalde blootstelling de chronische en carcinogene effecten van een stof bij een zoogdiersoort te bepalen.

Hiertoe worden de voor het carcinogeniteitsonderzoek gebruikte groepen aangevuld met ten minste een te behandelen satellietgroep en een controlesatellietgroep. De voor de satellietgroep met de hoogste dosis gebruikte dosis mag hoger zijn dan die welke voor de hoge dosisgroep in het carcinogeniteitsonderzoek wordt gebruikt. De dieren in het carcinogeniteitsonderzoek worden op algemene toxiciteit en carcinogene reactie onderzocht. De dieren in de behandelde satellietgroep worden onderzocht op algemene toxiciteit.

De teststof wordt normaal gesproken gedurende zeven dagen per week langs een geschikte toedieningsweg aan verscheidene groepen proefdieren gedurende het grootste deel van hun levensduur toegediend. Er wordt een dosis per groep gebruikt. Tijdens en na blootstelling aan de teststof worden de proefdieren dagelijks op tekenen van toxiciteit en zich ontwikkelende tumoren onderzocht.

#### 1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

#### 1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

Voor het onderzoek worden de dieren gedurende ten minste vijf dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Voor het onderzoek worden gezonde, jonge dieren op willekeurige wijze in te behandelen en controlegroepen ingedeeld.

#### Proefdieren

Er wordt de voorkeur gegeven aan ratten. Op grond van de resultaten van eerder uitgevoerd onderzoek mogen ook andere diersoorten (knaagdieren of niet-knaagdieren) worden gebruikt. Er dient gebruik te worden gemaakt van stammen van jonge, gezonde dieren die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt en met de dosering dient zo spoedig mogelijk na het verspenen te worden begonnen.

Bij het begin van het onderzoek mag het gewicht van de dieren niet meer dan  $\pm 20\%$  van het gemiddelde gewicht afwijken. Indien een studie naar de subchronische toxiciteit is uitgevoerd ter voorbereiding op een chronisch toxiciteitsonderzoek, dienen in beide studies dezelfde soort en stam te worden gebruikt.

#### Aantal en geslacht

Er dient gebruik te worden gemaakt van beide geslachten. Voor ieder dosisniveau en de parallelle controlegroep moeten ten minste 100 dieren (50 wijfjes en 50 mannetjes) worden gebruikt. De wijfjes moeten nulliparae zijn en mogen niet drachtig zijn. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal worden verhoogd met het aantal dieren dat volgens plan voor de voltooiing van de studie zal worden gedood.

De behandelde satellietgroep(en) voor de evaluatie van pathologische verschijnselen (behalve tumoren), moet(en) 20 dieren van elk geslacht omvatten, terwijl de satellietcontrolegroep tien dieren van elk geslacht dient te omvatten.

## Dosisniveaus en frequentie van blootstelling

Voor carcinogeniteitstesten dienen, naast de parallelle controlegroep, ten minste drie dosisniveaus te worden gebruikt. Het hoogste dosisniveau moet leiden tot tekenen van minimale toxiciteit, zoals een lichte achteruitgang van de gewichtstoename (minder dan 10%), zonder dat daardoor de normale levensduur van het dier als gevolg van andere effecten dan tumoren aanzienlijk wordt bekort.

Bij de laagste dosis mogen de normale groei, ontwikkeling en levensduur van het dier niet worden verstoord en mogen geen tekenen van toxiciteit optreden. In het algemeen dient deze dosis niet lager te zijn dan 10% van de hoogste dosis.

De tussenliggende doses moeten worden gekozen in een gebied halverwege tussen de hoge en de lage dosis.

Bij de keuze van de dosisniveaus dient rekening te worden gehouden met de gegevens uit eerder uitgevoerd toxiciteitsonderzoek.

Voor het onderzoek naar de chronische toxiciteit worden nog andere behandelde groepen en een controlesatellietgroep bij het onderzoek betrokken. De hoge dosis voor de dieren in de behandelde satellietgroep dient zo te worden gekozen dat er duidelijke tekenen van toxiciteit optreden.

De frequentie van de blootstelling is normaliter dagelijks. Indien de teststof in het drinkwater wordt toegediend of met het voer wordt gemengd, dient dit steeds beschikbaar te zijn.

## Controlegroepen

Er dient gebruik te worden gemaakt van een parallelle controlegroep die, afgezien van de blootstelling aan de teststof, in elk opzicht identiek is aan de behandelde groepen.

In speciale omstandigheden, zoals bij inhalatiestudies met aerosolen of het gebruik van een emulgator met onbekende biologische activiteit via de orale weg, dient ook een aanvullende controlegroep te worden gebruikt die niet aan het medium wordt blootgesteld.

## Toedieningsweg

De drie belangrijkste toedieningswegen zijn de orale, de dermale en de inhalatieweg. De keuze van de toedieningsweg hangt af van de fysische en chemische eigenschappen van de teststof en de meest waarschijnlijke blootstellingsroute bij de mens.

### Orale studies

Indien de teststof in het maag-darmkanaal wordt geresorbeerd en de blootstelling van de mens onder meer langs de orale weg geschiedt, verdient orale toediening de voorkeur, tenzij er contra-indicaties zijn. De dieren moeten de teststof toegediend krijgen in hun voedsel, opgelost in het drinkwater of via capsules. In het ideale geval dient de dosis zeven dagen per week dagelijks te worden toegediend, omdat bij dosering gedurende vijf dagen per week het dier zich in de tijd dat geen dosis wordt toegediend, eventueel herstelt of de toxiciteitsverschijnselen verdwijnen, waardoor de resultaten en de evaluatie daarvan kunnen worden beïnvloed. Voornamelijk uit praktische overwegingen echter wordt dosering gedurende vijf dagen per week aanvaardbaar geacht.

### Dermale studies

Dermale blootstelling door het aanbrengen van de teststof op de huid kan worden gekozen om een belangrijke blootstellingsroute bij de mens na te bootsen en als model voor de inductie van huidletsels.

### Inhalatiestudies

Aangezien bij inhalatiestudies de technische problemen ingewikkelder zijn dan bij andere toedieningswegen het geval is, volgen hieronder meer gedetailleerde aanwijzingen met betrekking tot deze wijze van toediening. Intratracheale instillatie is in specifieke omstandigheden wellicht een deugdelijk alternatief.

Bij chronische blootstellingen baseert men zich gewoonlijk op de verwachte praktijkomstandigheden in de industrie, in welk geval de dieren vijf dagen per week gedurende zes uur na het bereiken van de juiste concentratie in de blootstellingskamer worden blootgesteld (onderbroken blootstelling), of op een mogelijke expositie in het milieu, in welk geval de dieren zeven dagen per week gedurende 22 tot 24 uur per dag worden blootgesteld (continue blootstelling), met ongeveer een uur voor het voederen van de dieren (iedere dag op dezelfde tijd) en het schoonmaken van de kamers. In beide gevallen worden de dieren doorgaans blootgesteld aan een vaste concentratie van teststoffen. Een belangrijk verschil tussen onderbroken en continue blootstelling is dat er bij de eerste een periode van zeventien tot achttien uur is, waarin de dieren zich van de effecten van elke dagelijkse expositie kunnen herstellen; gedurende de weekindes is deze herstelperiode nog langer.

De keuze tussen onderbroken of continue blootstelling hangt af van de doeleinden van het onderzoek en van de na te bootsen blootstellingsomstandigheden bij de mens. Bepaalde technische moeilijkheden verdienen echter de aandacht. Zo kunnen bij voorbeeld de voordelen van continue blootstelling bij het nabootsen van de milieucondities wegvallen in verband met de noodzaak de dieren tijdens de blootstelling te eten en te drinken te geven, en de behoefte aan meer gecompliceerde en betrouwbare aerosol- en gasgeneratietechnieken en meettechnieken.

### Blootstellingskamers

De dieren worden aan de teststoffen blootgesteld in inhalatiekamers die zodanig gebouwd moeten zijn dat kan worden gezorgd voor een dynamische luchtdoorstroming van ten minste twaalf luchtverversingen per uur, een toereikend zuurstofgehalte en een gelijkmatige verdeling van de teststof in de atmosfeer. De controle- en blootstellingskamers moeten qua structuur identiek zijn, zodat, behalve waar het de blootstelling aan de teststoffen betreft, in alle opzichten vergelijkbare blootstellingsomstandigheden gewaarborgd zijn. Binnen in de kamer wordt over het algemeen een geringe onderdruk gehandhaafd om te voorkomen dat de teststof naar buiten lekt. De kamers dienen zodanig te zijn ontworpen dat de dieren elkaar zo min mogelijk verdringen. Als algemene regel voor het verzekeren van een stabiele atmosfeer in de blootstellingskamer geldt dat het totale volume van de proefdieren niet meer mag bedragen dan 5% van het volume van de kamer.

De volgende parameters moeten worden gemeten of gecontroleerd:

- i) Luchtdoorstroming: het aantal luchtverversingen per uur in de kamer dient bij voorkeur continu te worden gemeten.
- ii) Tijdens de dagelijkse blootstelling mag de concentratie niet meer dan  $\pm 15\%$  van het gemiddelde afwijken. Tijdens de gehele duur van de studie moeten de dagelijkse concentraties zo constant mogelijk worden gehouden.
- iii) Temperatuur en vochtigheid: voor knaagdieren dient de temperatuur op  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) en de vochtigheid in de kamer op 30 tot 70% te worden gehouden, behalve wanneer water wordt gebruikt om de teststof in de atmosfeer van de blootstellingskamer te verstuiven. Beide waarden dienen bij voorkeur continu te worden gemeten.
- iv) Metingen van de deeltjesgrootte: wanneer de atmosfeer vloeibare of vaste aerosolen bevat, dient de verdeling van de deeltjesgrootte te worden bepaald. De aerosoldeeltjes dienen een zodanige afmeting te hebben dat zij voor de gebruikte proefdieren in te ademen zijn. Monsters van de atmosfeer dienen te worden genomen op ademhalingshoogte van de dieren. Het luchtmonster dient representatief te zijn voor de verdeling van de deeltjes waaraan de dieren zijn blootgesteld en dient, op gravimetrische basis, alle gesuspendeerde aerosoldeeltjes te bevatten, zelfs wanneer een groot gedeelte van de aerosoldeeltjes niet in te ademen is. Gedurende de werking van de apparatuur voor de verstuiwing van deeltjes moeten regelmatig analyses worden uitgevoerd van de deeltjesgrootte, ten einde de stabiliteit van de aerosol na te gaan, en daarna tijdens de blootstelling zo vaak als nodig is om de stabiliteit van de verdeling van de deeltjesgrootte waaraan de dieren zijn blootgesteld, te bepalen.

### Duur van het onderzoek

Het gedeelte van het onderzoek dat betrekking heeft op de carcinogeniteit, beslaat het grootste deel van de normale levensduur van de proefdieren. Het onderzoek dient te worden beëindigd na achttien maanden voor muizen en hamsters en 24 maanden voor ratten; voor bepaalde dierstammen met een langere levensduur en/of een laag percentage spontane tumoren dient de studie te worden beëindigd na 24 maanden voor muizen en hamsters en na 30 maanden voor ratten. Een dergelijk uitgebreid onderzoek mag evenwel worden beëindigd wanneer het aantal overlevende dieren in de groep met de laagste dosis of in de controlegroep 25% bedraagt. Indien blijkt dat de geslachten duidelijk verschillend reageren, dienen de geslachten afzonderlijk te worden beschouwd. Als alleen dieren in de groep met de hoogste dosis voortijdig sterven en dit duidelijk aan toxiciteit te wijten is, betekent dit niet dat de studie moet worden beëindigd, mits de toxische verschijnselen bij de andere groepen geen problemen opleveren. Wil een negatief testresultaat aanvaardbaar zijn, dan mag niet meer dan 10% van een groep voor het experiment verloren gaan als gevolg van autolyse, kannibalisme of huisvestingsproblemen, en moet het percentage overlevende dieren in alle groepen na achttien maanden voor muizen en hamsters en na 24 maanden voor ratten ten minste 50% bedragen.

De satellietgroepen van 20 behandelde dieren per geslacht en de tien controledieren per geslacht die worden gebruikt voor de chronische toxiciteitstests, dienen ten minste twaalf maanden te worden onderzocht. Deze dieren dienen te worden gedood met het oog op een beoordeling van de door de teststof veroorzaakte pathologie, waarbij geriatrische veranderingen geen rol mogen spelen.

### Uitvoering

#### Waarnemingen

De dieren moeten dagelijks in hun kooien worden geobserveerd. Daarbij dient aandacht te worden geschonken aan veranderingen in huid en vacht, ogen en slijmvliezen, alsmede ademhaling, bloedsomloop, het autonome en centrale zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag.

Op gezette tijden dienen de dieren in de behandelde satellietgroep(en) klinisch te worden onderzocht.

De dieren moeten regelmatig worden geobserveerd om te voorkomen dat zij voor het onderzoek verloren gaan als gevolg van oorzaken als kannibalisme, autolyse van weefsels of het op verkeerde wijze in kooien stoppen. Indien stervende dieren worden aangetroffen, dienen deze te worden verwijderd; op hen wordt necropsie verricht.

Voor alle dieren moeten de klinische tekenen, inclusief neurologische en oculaire veranderingen, alsmede de sterfte worden vastgelegd. Bijzondere aandacht moet worden besteed aan zich ontwikkelende tumoren; het tijdstip waarop toxische verschijnselen voor het eerst optreden, en het verloop ervan dienen te worden opgetekend; van elke met het blote oog zichtbare of voelbare tumor moeten het tijdstip waarop deze voor het eerst is opgetreden, de plaats, de afmetingen, het uiterlijk en het verloop worden opgetekend.

Het verbruik van voer (en water wanneer de teststof in het drinkwater wordt toegediend) dient gedurende de eerste dertien weken van het onderzoek wekelijks te worden gemeten en vervolgens ongeveer om de drie maanden, tenzij wijzigingen in de gezondheidstoestand of het lichaamsgewicht van het dier anders voorschrijven.

Gedurende de eerste dertien weken van het onderzoek dient het lichaamsgewicht voor elk dier afzonderlijk eens per week te worden vastgelegd; daarna ten minste om de vier weken.

#### *Klinisch onderzoek*

##### Hematologie

Een hematologisch onderzoek (bij voorbeeld hemoglobinegehalte, hematocriet, totaal aantal rode bloedlichaampjes, totaal aantal witte bloedlichaampjes, bloedplaatjes of andere metingen van de stollingseigenschappen) dient te worden verricht na drie maanden, zes maanden en vervolgens om de zes maanden en aan het eind van het onderzoek op bloedmonsters van tien ratten per geslacht uit alle groepen. Indien mogelijk dienen deze monsters telkens afkomstig te zijn van dezelfde ratten.

Indien op grond van de observatie van de dieren in de kooien wordt vermoed dat de gezondheidstoestand van de dieren tijdens het onderzoek achteruitgaat, dient bij de betrokken dieren een differentiële telling van bloedcellen te worden uitgevoerd.

Een differentiële telling van bloedcellen wordt uitgevoerd op monsters afkomstig van de dieren in de hoogste dosisgroep en de controlegroep. Bij de daaropvolgende lagere groep(en) worden alleen differentiële tellingen van bloedcellen verricht als er tussen de hoogste groep en de controlegroepen een groot verschil bestaat of als daartoe op grond van het pathologisch onderzoek een indicatie wordt gegeven.

##### Urineonderzoek

Er dienen unrinemonsters te worden genomen van tien ratten per geslacht uit alle groepen, indien mogelijk met dezelfde tussenpozen als bij het bloedonderzoek hierboven. In het geval van knaagdieren dienen bij de afzonderlijke dieren of op een samengevoegd monster per geslacht per groep de volgende bepalingen te worden verricht:

- uiterlijk: volume en dichtheid voor de afzonderlijke dieren;
- eiwit, glucose, ketonen, occult bloed (semi-kwantitatief);
- en
- microscopie van sediment (semi-kwantitatief).

##### Klinische biochemie

Ongeveer om de zes maanden en aan het eind van het onderzoek worden bloedmonsters voor klinisch-biochemische metingen genomen bij alle niet-knaagdieren en bij tien ratten per geslacht uit alle groepen, indien mogelijk steeds bij dezelfde ratten. Bij niet-knaagdieren dient bovendien voor het onderzoek een monster te worden genomen. Uit deze monsters wordt het plasma bereid waarop de volgende bepalingen worden verricht:

- totaal eiwitgehalte;
- albuminegehalte;
- leverfunctietesten (zoals alkalische fosfataseactiviteit, glutamaatpyruvaattransaminase<sup>(1)</sup>activiteit en glutamaatoxaalacetaattransaminase<sup>(2)</sup>activiteit), gammaglutamyltranspeptidase, ornithinedecarboxylase;
- koolhydraatstofwisseling, zoals nuchter glucosegehalte van het bloed;
- nierfunctietesten zoals ureumstikstof in het bloed.

<sup>(1)</sup> Thans bekend als serumalanineaminotransferase.

<sup>(2)</sup> Thans bekend als serumaspartaataminotransferase.



## Macroscopische necropsie

Op alle dieren, ook die welke tijdens het experiment stierven of gedood werden toen zij stervende waren, moet een volledig macroscopisch onderzoek worden verricht. Van alle dieren moet, voordat zij gedood worden, een bloedmonster worden genomen voor differentiële tellingen van bloedcellen. Alle met het blote oog zichtbare tumoren of letsels waarvan wordt aangenomen dat het tumoren zijn, dienen te worden bewaard. Getracht moet worden om de macroscopische waarnemingen te correleren aan de microscopische bevindingen.

Alle organen en weefsels dienen voor microscopisch onderzoek te worden bewaard. Gewoonlijk zijn dat de organen en weefsels: hersenen<sup>(1)</sup> (medulla/pons, cortex cerebelli, cortex cerebri), hypofyse, schildklier (met bijschildklieren), thymus, longen (met luchtpijp), hart, aorta, speekselklieren, lever<sup>(1)</sup>, milt, nieren<sup>(1)</sup>, bijniere(n)<sup>(1)</sup>, slokdarm, maag, duodenum, jejunum, ileum, blinde darm, colon, rectum, uterus, urineblaas, lymfklieren, alvleesklier, geslachtsklieren<sup>(1)</sup>, secundaire geslachtsorganen, vrouwelijke borstklier, huid, spieren, perifere zenuwen, ruggemerg (cervicaal, thoracaal, lumbaal), borstbeen met beenmerg, dijbeen (met gewricht) en ogen.

Vullen van de longen en urineblaas met een fixatief is de beste manier om deze weefsels te bewaren. Bij inhalatiestudies is het vullen van de longen van wezenlijk belang voor een goed histopathologisch onderzoek. Bij speciale studies zoals inhalatiestudies dient de gehele tractus respiratorius te worden onderzocht, met inbegrip van neus, pharynx en larynx.

Indien nog ander klinisch onderzoek wordt verricht, dient de daaruit verkregen informatie voor het microscopisch onderzoek beschikbaar te zijn, omdat dit voor de patholoog belangrijke aanwijzingen kan bevatten.

## Histopathologie

Voor het gedeelte van het onderzoek dat betrekking heeft op de chronische toxiciteit:

Alle bewaarde organen van alle dieren uit de satellietgroep met de hoge dosis en de controlegroep moeten uitvoerig worden onderzocht. Als in de satellietgroep met de hoogste dosis sprake is van pathologische verschijnselen die door de teststof worden veroorzaakt, moeten de aangetaste organen van alle andere dieren in alle andere behandelde satellietgroepen en die uit de behandelde groepen in het gedeelte van het onderzoek dat op de carcinogeniteit betrekking heeft, aan het eind van het onderzoek aan een volledig en uitvoerig histologisch onderzoek worden onderworpen.

Voor het gedeelte van het onderzoek dat betrekking heeft op de carcinogeniteit:

- a) Er dient een volledig histopathologisch onderzoek te worden uitgevoerd op de organen en weefsels van alle dieren die tijdens het onderzoek sterven of worden gedood, en alle dieren uit de controlegroepen en de groep met de hoge dosis.
- b) Bij alle groepen moeten alle, in enig orgaan voorkomende, met het blote oog zichtbare tumoren of letsels waarvan wordt vermoed dat het tumoren zijn, worden onderzocht.
- c) Indien er tussen de hoge-dosisgroep en de controlegroepen een aanzienlijk verschil bestaat in de incidentie van neoplastische letsels, dient een histopathologisch onderzoek te worden verricht op het orgaan of weefsel in kwestie bij de andere dosisgroepen.
- d) Als het aantal overlevende dieren in de groep met de hoogste dosis aanmerkelijk kleiner is dan in de controlegroep, moet de eerstvolgende lagere dosisgroep volledig worden onderzocht.
- e) Indien bij de hoogste dosisgroep blijkt dat er toxische of andere effecten geïnduceerd worden die van invloed zouden kunnen zijn op de neoplastische respons, dan dient de eerstvolgende lagere dosisgroep volledig te worden onderzocht.

## 2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het aantal dieren waarbij tijdens het onderzoek tumoren of toxische effecten zijn ontdekt, het tijdstip waarop deze zijn ontdekt, en het aantal dieren waarbij, nadat deze zijn gedood, tumoren zijn aangetroffen. De resultaten moeten met behulp van een voor dit doel geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

## 3. VERSLAGGEVING

### 3.1. Verslag van de proefnemingen

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

— diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voer, enzovoort;

<sup>(1)</sup> Deze organen, afkomstig van tien dieren per geslacht per groep voor knaagdieren, dienen te worden gewogen.

— proefomstandigheden:

Beschrijving van de blootstellingsapparatuur:

Met inbegrip van ontwerp, type, afmetingen, luchtbron, systeem voor het bereiden van stof- en vloeistofaërosolen, methode voor het conditioneren van de lucht, behandeling van de afgewerkte lucht en wijze waarop de dieren tijdens de proeven in een blootstellingskamer zijn ondergebracht als deze wordt gebruikt. Er moet een beschrijving worden gegeven van de apparatuur voor het meten van de temperatuur, de vochtigheid en, in voorkomend geval, de stabiliteit van de concentratie en de deeltjesgrootte van de aërosolen.

Gegevens betreffende de blootstelling:

Deze moeten in tabelvorm worden gerangschikt en worden voorzien van gemiddelde waarden en een maat voor de variabiliteit (bij voorbeeld standaarddeviatie). Ze dienen te omvatten:

- a) het aantal luchtverversingen per uur in de inhalatieapparatuur;
  - b) temperatuur en vochtigheid van de lucht;
  - c) nominale concentraties (de totale hoeveelheid teststof die de inhalatieapparatuur wordt binnengeleid, gedeeld door het luchtvolume);
  - d) aard van het eventuele medium;
  - e) feitelijke concentraties van de teststof in het ademhalingsgebied van de dieren;
  - f) mediaan van de deeltjesgrootte (in voorkomend geval).
- dosisniveaus (met het eventuele medium) en concentraties;
- gegevens over de tumorincidentie naar geslacht, dosis en type tumor;
- tijdstip gedurende het onderzoek waarop de dood intreedt of aangeven of dieren tot het eind van de proef in leven bleven (ook voor de satellietgroep);
- gegevens over de toxische reactie naar geslacht en dosis;
- beschrijving van toxische of andere effecten;
- tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en verloop hiervan;
- oftalmologische bevindingen;
- gegevens over voedsel en lichaamsgewicht;
- resultaten van hematologisch onderzoek;
- resultaten van klinisch-biochemisch onderzoek (resultaten van het urineonderzoek inbegrepen);
- bevindingen van de necropsie;
- gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
- statistische verwerking van de resultaten met een beschrijving van de gebruikte methoden;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

### 3.2. Evaluatie en interpretatie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

## 4. LITERATUUR

Zie Algemene inleiding — Deel B.

## B.34 REPRODUKTIE TOXICITEITSONDERZOEK OVER ÉÉN GENERATIE

### 1. METHODE

#### 1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

#### 1.2. Definities

Zie Algemene inleiding — Deel B.

#### 1.3. Referentiestoffen

Geen.

#### 1.4. Principe van de onderzoekmethode

De teststof wordt in geleidelijk stijgende doseringen aan verscheidene groepen mannelijke en vrouwelijke dieren toegediend. Aan de mannetjes dient de teststof gedurende de groei en gedurende ten minste één volledige spermatogene cyclus (ongeveer 56 dagen bij de muis en 70 dagen bij de rat) toegediend te worden, ten einde eventuele, door de teststof veroorzaakte nadelige effecten op de spermatogenese aan het licht te brengen.

Aan de vrouwelijke ouderdieren (P-generatie) moet de teststof ten minste gedurende twee volledige oestruscycli worden toegediend, ten einde eventuele door de teststof veroorzaakte nadelige effecten op de oestrus aan het licht te brengen. Vervolgens laat men de dieren paren. Gedurende de paartijd wordt de teststof aan beide geslachten toegediend; daarna alleen aan de wijfjes gedurende de dracht en de zoogtijd. Bij toediening van de teststof via inhalatie zal de methode op een aantal punten moeten aangepast.

#### 1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

#### 1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

##### *Vorbereidingen*

Voor het onderzoek worden gezonde, jonge dieren op willekeurige wijze in de te behandelen en controlegroepen ingedeeld. Voor het onderzoek worden de dieren ten minste vijf dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Aanbevolen wordt de teststof in het voedsel of drinkwater toe te dienen. Ook andere toedieningswegen komen in aanmerking. De teststof moet bij alle dieren voor de gehele duur van het experiment op dezelfde manier worden toegediend. Indien een medium of andere additieven worden gebruikt om de dosering te vergemakkelijken, moet ervan bekend zijn dat zij geen toxische effecten veroorzaken.

Toediening geschiedt gedurende zeven dagen per week.

##### *Proefdieren*

##### *Selectie van de soort*

Er wordt de voorkeur gegeven aan ratten of muizen. Stammen met een lage vruchtbaarheid dienen niet te worden gebruikt. Er dient gebruik te worden gemaakt van gezonde dieren die nog niet eerder aan experimenten zijn onderworpen. Van de proefdieren dienen soort, stam, geslacht, gewicht en/of leeftijd bekend te zijn.

Voor een juiste beoordeling van de vruchtbaarheid dienen zowel de mannetjes als de wijfjes te worden onderzocht. Alle behandelde en controledieren dienen gespeend te zijn voordat met de dosering wordt begonnen.

##### *Aantal en geslacht*

Elke behandelde en controlegroep dient zoveel dieren te bevatten dat er steeds ongeveer 20 drachtige wijfjes zijn die op ongeveer hetzelfde tijdstip verwacht worden te werpen.

Dit om te komen tot voldoende drachten en nakomelingen om een zinvolle evaluatie te kunnen maken van de mogelijke effecten van de stof op de vruchtbaarheid, de dracht en het gedrag van de moeder bij de dieren van de oudergeneratie en het zogen, de groei en de ontwikkeling van de F<sub>1</sub>-generatie vanaf de conceptie tot aan de spening.

## Proefomstandigheden

Voer en water dienen ad libitum te worden verstrekt. Vlak voor de partus moeten de drachtige wijfjes apart in speciale hokken worden ondergebracht; eventueel kan nestmateriaal worden verstrekt.

## Dosisniveaus

Er dienen ten minste drie dosisgroepen en een controlegroep te worden gebruikt. Indien bij de toediening van de teststof van een medium gebruik wordt gemaakt, dient dit aan de controlegroep in het hoogste gebruikte volume toegediend te worden. Indien een teststof leidt tot een verminderde voeropname of -absorptie, dan kan het noodzakelijk zijn een parallelle controlegroep te gebruiken. In het ideale geval moet het hoogste dosisniveau bij de ouderdieren leiden tot toxische verschijnselen, maar niet tot sterfte, tenzij zulks op grond van de fysisch-chemische eigenschappen of de biologische effecten van de teststof onmogelijk is. In het ideale geval moeten de tussenliggende doses leiden tot minimale toxische effecten die aan de teststof zijn toe te schrijven, en mag de lage dosis niet tot enige waarneembare nadelige effecten bij de ouders of de nakomelingen leiden. Wanneer de teststof via een maagsonde of in capsules wordt toegediend, moet de aan elk dier toegediende dosis gebaseerd zijn op het lichaamsgewicht van het dier en wekelijks aan het gewijzigde lichaamsgewicht worden aangepast. Bij drachtige wijfjes kan de dosis desgewenst gebaseerd worden op het lichaamsgewicht op dag nul of dag zes van de dracht.

## Hoogste te testen dosis

Indien stoffen met een lage toxiciteit bij een dosisniveau van ten minste 1 000 mg/kg het voortplantingsvermogen op generlei wijze blijkt te zijn verstoord, zijn studies bij andere dosisniveaus wellicht niet noodzakelijk. Indien uit een voorafgaand onderzoek bij het hoge dosisniveau waarbij duidelijke tekenen van toxiciteit bij het moederdier voorkomen geen nadelige effecten op de vruchtbaarheid blijken, zijn studies bij andere dosisniveaus wellicht niet noodzakelijk.

## Uitvoering van het onderzoek

### Tijdschema

Met de dagelijkse toediening van de teststof aan de mannelijke ouderdieren dient te worden begonnen wanneer deze vijf à negen weken oud zijn, nadat zij zijn gespeend en gedurende ten minste vijf dagen aan de proefomstandigheden zijn gewend. Bij ratten wordt de teststof gedurende tien weken vóór de paartijd toegediend (bij muizen gedurende acht weken). De mannetjes kunnen hetzij aan het einde van de paartijd worden gedood en onderzocht, hetzij op hun voer met de teststof in leven worden gehouden voor de eventuele voortbrenging van een tweede nest en dan enige tijd voor het eind van het onderzoek worden gedood en onderzocht. Bij vrouwelijke ouderdieren dient met de dosering na ten minste vijf dagen van gewenning aan de proefomstandigheden te worden begonnen en deze dient ten minste twee weken te hebben geduurd vóór de paring plaatsvindt. De dagelijkse toediening van de teststof aan de vrouwelijke ouderdieren dient te worden voortgezet gedurende de hele paringstijd van drie weken, de dracht en tot aan het spenen van de nakomelingen van de eerste generatie. Er dient aandacht te worden geschonken aan wijzigingen in het doseringsschema op grond van andere beschikbare informatie over de teststof, zoals inductie van het teststofmetabolisme of bioaccumulatie.

### Paring

Bij studies naar de reproductietoxiciteit kan men hetzij één mannetje met één wijfje (1:1) of één mannetje met twee wijfjes (1:2) laten paren.

In het eerste geval (1:1) wordt één wijfje bij hetzelfde mannetje geplaatst totdat het drachtig is of er drie weken zijn verstreken. Elke ochtend worden de wijfjes onderzocht op de aanwezigheid van sperma of vaginale plugs. Dag nul van de dracht is de dag waarop een vaginale plug of sperma wordt aangetroffen, waarbij rekening wordt gehouden met de spermatogenese.

Bij de paartjes waarbij de paring mislukt, dient te worden nagegaan wat de oorzaak van deze kennelijke onvruchtbaarheid is. Dit kan onder meer geschieden door de dieren nogmaals te laten paren, maar dan met vader- of moederdieren van bewezen vruchtbaarheid, door microscopisch onderzoek van de voortplantingsorganen en onderzoek van de oestruscyclus of de spermatogenese.

### Nestgrootte

De dieren waaraan gedurende het vruchtbaarheidsonderzoek de teststof wordt toegediend, worden in de gelegenheid gesteld normaal te werpen en hun jongen tot de spientijd groot te brengen. De nestgrootte wordt hierbij niet gestandaardiseerd.

Als standaardisatie wel gebeurt, dan wordt voorgesteld als volgt tewerk te gaan. Tussen de eerste en de vierde dag na de geboorte kan de grootte van elk nest worden aangepast door het teveel aan jongen, via selectie, uit het nest te nemen om uiteindelijk vier mannetjes en vier wijfjes per nest over te houden.

Indien het aantal mannetjes of wijfjes niet voldoende is om er per nest vier van elk geslacht over te houden, kan worden volstaan met een gedeeltelijke aanpassing (bij voorbeeld vijf mannetjes en drie wijfjes). Een en ander is niet van toepassing op nesten met minder dan acht jongen.

## Waarnemingen

Gedurende de hele onderzoeksperiode wordt elk dier ten minste eenmaal per dag geobserveerd. Met de teststof samenhangende veranderingen in het gedrag, tekenen van een moeilijke of langdurige geboorte en alle tekenen van toxiciteit, inclusief sterfte, dienen te worden vastgelegd. Gedurende de tijd die aan de paring voorafgaat en de paartijd dient het verbruik van voer wekelijks te worden gemeten. Tijdens de dracht kan het verbruik van voer eventueel dagelijks worden gemeten. Na het werpen en tijdens de zoogtijd dient het verbruik van voer (en van water indien de teststof met het drinkwater wordt toegediend) te worden gemeten op dezelfde dag als de nesten worden gewogen. De mannelijke en vrouwelijke ouderdieren moeten worden gewogen op de eerste dag dat zij de teststof krijgen toegediend en daarna eenmaal per week. Deze waarnemingen moeten voor elk volwassen dier afzonderlijk worden vastgelegd.

De drachttijd dient te worden berekend vanaf dag nul van de dracht. Elke worp dient zo spoedig mogelijk na de geboorte te worden onderzocht, ten einde het aantal en geslacht van de jongen vast te stellen, alsmede het aantal dood- en levendgeboren jongen en de aanwezigheid van met het blote oog zichtbare afwijkingen.

Dode jongen en jongen die op de vierde dag worden gedood, dienen te worden bewaard en op eventuele afwijkingen te worden onderzocht. De levende jongen moeten worden geteld en de nesten moeten worden gewogen op de ochtend na de geboorte, op de vierde en de zevende dag en vervolgens wekelijks tot het eind van het onderzoek, wanneer de dieren afzonderlijk dienen te worden gewogen. De bij de moederdieren en nakomelingen waargenomen lichamelijke of gedragsafwijkingen dienen te worden opgetekend.

## Pathologie

### Necropsie

Wanneer er ouderdieren tijdens het onderzoek worden gedood of sterven, dienen zij macroscopisch te worden onderzocht op eventuele structurele afwijkingen of pathologische veranderingen, waarbij speciaal aandacht moet worden geschonken aan de voortplantingsorganen. Dode of stervende jongen moeten op afwijkingen worden onderzocht.

### Histopathologie

Van alle ouderdieren moeten de eierstokken, uterus, cervix, vagina, testes, epididymides, zaadblaasjes, prostaat, coagulans afscheidende klier, de hypofyse en aangetaste organen voor microscopisch onderzoek worden bewaard. In het geval dat deze organen nog niet bij andere onderzoeken, waarbij herhaalde doseringen zijn toegediend, zijn onderzocht, dienen zij microscopisch te worden onderzocht bij alle dieren uit de hoogste dosisgroep en de controlegroep en de dieren die tijdens het onderzoek sterven.

De organen die bij deze dieren afwijkingen vertonen, dienen vervolgens bij alle andere ouderdieren te worden onderzocht. In deze gevallen dienen alle weefsels die met het blote oog zichtbare pathologische veranderingen vertonen, microscopisch te worden onderzocht. Zoals hierboven reeds werd gesuggereerd, kunnen de voortplantingsorganen van dieren waarvan wordt vermoed dat zij onvruchtbaar zijn, aan een microscopisch onderzoek worden onderworpen.

## 2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het aantal vruchtbare mannetjes, het aantal drachtige wijfjes, de aard van de veranderingen en het percentage dieren dat elk type verandering vertoont.

Indien mogelijk, moeten alle numerieke resultaten met behulp van een voor dit doel geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere algemeen erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

## 3. VERSLAGGEVING

### 3.1. Verslag van de proefnemingen

In het verslag moeten, indien mogelijk, ook de volgende gegevens worden opgenomen:

- gebruikte diersoort/stam;
- gegevens over de toxische reactie naar geslacht en dosis, met inbegrip van vruchtbaarheid, dracht en levensvatbaarheid;

- tijdstip gedurende het onderzoek waarop de dood intreedt of aangeven of dieren tot de tijd waarop zij volgens plan zouden worden gedood of tot het einde van de proef in leven bleven;
- tabel met het gewicht van elke worp, het gemiddelde gewicht van de jongen en het gewicht van elk jong afzonderlijk aan het eind van het onderzoek;
- toxische of andere effecten op de reproductie, het nageslacht, postnatale groei, enzovoort;
- dag waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en verloop hiervan;
- gegevens over het lichaamsgewicht van de ouderdieren;
- bevindingen van de necropsie;
- gedetailleerde beschrijving van eventuele microscopische bevindingen;
- statistische verwerking van de resultaten, waar dat van toepassing is;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

### 3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

### 4. **LITERATUUR**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

---

1. **METHODE**

1.1. **Inleiding**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. **Definities**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. **Referentiestoffen**

Geen.

1.4. **Principe van de onderzoekmethode**

De teststof wordt in geleidelijk stijgende doseringen aan verscheidene groepen mannelijke en vrouwelijke proefdieren toegediend. Aan de mannelijke ouderdieren (P-generatie) dient de teststof te worden toegediend gedurende de groei en gedurende ten minste één volledige spermatogene cyclus (ongeveer 56 dagen bij de muis en 70 dagen bij de rat), ten einde eventuele door de teststof veroorzaakte nadelige effecten op de spermatogenese aan het licht te brengen. Aan de vrouwelijke ouderdieren (P-generatie) moet de teststof gedurende ten minste twee volledige oestruscycli worden toegediend, ten einde eventuele door de teststof veroorzaakte nadelige effecten op de oestrus aan het licht te brengen. Na het spenen van de F<sub>1</sub>-generatie wordt de toediening van de teststof bij deze nakomelingen voortgezet en wel gedurende de groei tot aan hun volwassenheid, gedurende de paring en de voortbrenging van een tweede generatie tot het tijdstip waarop de tweede generatie wordt gespeend. Bij toediening van de teststof via inhalatie zal de methode op een aantal punten moeten worden aangepast.

1.5. **Kwaliteitscriteria**

Geen.

1.6. **Beschrijving van de onderzoekmethode**

*Vorbereidingen*

Voor het onderzoek worden gezonde dieren op willekeurige wijze in te behandelen en controlegroepen ingedeeld. Voor het onderzoek worden de ouderdieren gedurende ten minste vijf dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Aanbevolen wordt de teststof in het voedsel of drinkwater toe te dienen. Ook andere toedieningswegen komen in aanmerking. De teststof moet bij alle dieren voor de gehele duur van het experiment op dezelfde manier worden toegediend. Indien een medium of andere additieven worden gebruikt om de dosering te vergemakkelijken, moet ervan bekend zijn dat zij geen toxische effecten veroorzaken. Toediening geschiedt gedurende zeven dagen per week.

**Proefdieren: Selectie van de soort**

Er wordt de voorkeur gegeven aan ratten of muizen.

Stammen met een lage vruchtbaarheid dienen niet te worden gebruikt. Er dient gebruik te worden gemaakt van gezonde ouderdieren die nog niet eerder aan experimenten zijn onderworpen. Van de proefdieren dienen soort, stam, geslacht, gewicht en/of leeftijd bekend te zijn.

Voor een juiste beoordeling van de vruchtbaarheid dienen zowel de mannetjes als de wijfjes te worden onderzocht. Alle behandelde en controledieren dienen gespeend te zijn voordat met de dosering wordt begonnen.

**Aantal en geslacht**

Elke behandelde en controlegroep dient zoveel dieren te bevatten dat er steeds ongeveer 20 drachtige wijfjes zijn die op ongeveer hetzelfde tijdstip verwacht worden te werpen. Dit om te komen tot voldoende drachten en nakomelingen om een zinvolle evaluatie te kunnen maken van de mogelijke effecten van de teststof op de

vruchtbaarheid, de dracht en het gedrag van de moeder, het zogen, de groei en de ontwikkeling van de F<sub>1</sub>-generatie vanaf de conceptie tot aan de geslachtsrijpheid, alsmede de ontwikkeling van de tweede generatie tot aan het spenen.

### *Proefomstandigheden*

Voer en water dienen ad libitum te worden verstrekt. Vlak voor de partus moeten de drachtige wijfjes apart in speciale kooien worden ondergebracht; eventueel kan nestmateriaal worden verstrekt.

### Dosisniveaus

Er moeten ten minste drie dosisgroepen en een controlegroep worden gebruikt. Indien bij de toediening van de teststof van een medium gebruik wordt gemaakt, dient dit aan de controlegroep in het hoogste gebruikte volume toegediend te worden. Indien een teststof leidt tot een verminderde voeropname of -absorptie, kan het gebruik van een parallelle controlegroep nodig zijn. In het ideale geval dient het hoogste dosisniveau bij de ouderdieren te leiden tot toxische effecten van de teststof niet mogelijk is. In het ideale geval dienen de tussenliggende doses te leiden tot minimale aan de teststof toe te schrijven effecten en dient de laagste dosis bij de ouderdieren of de nakomelingen niet tot enige waarneembare nadelige effecten te leiden. Wanneer de teststof via een maagsonde of in capsules wordt toegediend, moet de aan elk dier toegediende dosis gebaseerd zijn op het lichaamsgewicht van het dier en wekelijks worden aangepast. Bij drachtige wijfjes kan de dosis desgewenst worden gebaseerd op het lichaamsgewicht op dag nul of dag zes van de dracht.

### Hoogste te testen dosis

Indien bij stoffen met een lage toxiciteit bij een dosisniveau van ten minste 1 000 mg/kg het voortplantingsvermogen op generlei wijze blijkt te zijn verstoord, zijn studies bij andere dosisniveaus wellicht niet noodzakelijk. Indien uit een vorige studie bij het hoge dosisniveau waarbij duidelijke tekenen van toxiciteit bij het moederdier voorkomen geen nadelige effecten op de vruchtbaarheid blijken, zijn studies bij andere dosisniveaus wellicht niet noodzakelijk.

### *Uitvoering van het onderzoek*

#### Tijdschema

Met de dagelijkse toediening van de teststof aan de mannelijke ouderdieren dient te worden begonnen wanneer deze vijf à negen weken oud zijn, nadat zij zijn gespeend en gedurende ten minste vijf dagen aan de proefomstandigheden zijn gewend. Bij ratten wordt de teststof gedurende tien weken vóór de paartijd toegediend (bij muizen gedurende acht weken). De mannetjes kunnen aan het eind van de paartijd worden gedood en onderzocht, of op hun voer met de teststof in leven worden gehouden voor de eventuele voortbrenging van een tweede nest en dan enige tijd voor het eind van het onderzoek worden gedood en onderzocht.

Bij vrouwelijke ouderdieren dient met de dosering na ten minste vijf dagen van gewenning aan de proefomstandigheden te worden begonnen en deze dient ten minste twee weken te hebben geduurd vóór de paring plaatsvindt. De dagelijkse toediening van de teststof aan de vrouwelijke ouderdieren dient te worden voortgezet gedurende de hele paartijd van drie weken, de dracht en tot aan het spenen van de nakomelingen van de eerste generatie. Er dient aandacht te worden geschonken aan wijzigingen in het doseringsschema op grond van de beschikbare informatie over de teststof, zoals inductie van het teststofmetabolisme of bioaccumulatie.

De dosering bij de dieren van de eerste generatie begint nadat zij zijn gespeend en eindigt wanneer zij worden gedood.

#### Paring

Bij studies naar de reproductietoxiciteit kan men hetzij één mannetje met één wijfje (1:1) of één mannetje met twee wijfjes (1:2) laten paren.

In het eerste geval moet één wijfje bij hetzelfde mannetje worden geplaatst totdat het drachtig is of er 3 weken zijn verstreken. Elke ochtend worden de wijfjes onderzocht op de aanwezigheid van sperma of vaginale plugs. Dag nul van de dracht is de dag waarop een vaginale plug of sperma wordt waargenomen. Rekening houdend met de spermatogenese dient men de nakomelingen van de eerste generatie pas te laten paren wanneer zij ten minste elf weken (muizen) of dertien weken (ratten) oud zijn. Voor de paring van de nakomelingen van de eerste generatie worden uit elk nest willekeurig een mannetje en een wijfje gekozen, die men dan kruist met een jong uit een ander nest van dezelfde dosisgroep, ten einde de tweede generatie te verkrijgen. Mannetjes en wijfjes van de eerste generatie die niet voor de paring zijn gebruikt, worden na het spenen gedood.



De paartjes waarbij de paring mislukt, dienen te worden onderzocht om de oorzaak van de kennelijke onvruchtbaarheid te bepalen. Dit kan onder meer geschieden door de dieren nogmaals te laten paren, maar dan met andere vader- of moederdieren van bewezen vruchtbaarheid, door microscopisch onderzoek van de voortplantingsorganen en door onderzoek van de oestruscycli of de spermatogenese.

### Nestgrootte

De dieren waaraan gedurende het vruchtbaarheidsonderzoek de teststof wordt toegediend, krijgen de gelegenheid normaal te werpen en hun jongen tot de spientijd groot te brengen. De nestgrootte wordt hierbij niet gestandaardiseerd.

Als standaardisatie wel gebeurt, dan wordt voorgesteld als volgt tewerk te gaan. Tussen de eerste en de vierde dag na de geboorte kan de grootte van elk nest worden aangepast door het teveel aan jongen, via selectie, uit het nest te nemen om waar mogelijk 4 mannetjes en 4 wijfjes per nest over te houden. Wanneer het aantal mannelijke of vrouwelijke jongen niet toereikend is om er per nest vier van elk geslacht over te houden, kan worden volstaan met gedeeltelijke aanpassing (bij voorbeeld vijf mannetjes en drie wijfjes). Een en ander is niet van toepassing op nesten met minder dan acht jongen. Aanpassing van de nesten van de tweede generatie geschiedt op dezelfde manier.

### Waarnemingen

Gedurende de hele onderzoeksperiode wordt elk dier ten minste eenmaal per dag geobserveerd. Met de teststof samenhangende veranderingen in het gedrag, tekenen van een moeilijke of langdurige geboorte en alle tekenen van toxiciteit, met inbegrip van sterfte, dienen te worden vastgelegd. Gedurende de tijd die aan de paring voorafgaat en de paartijd zelf dient het verbruik van voer wekelijks te worden gemeten. Tijdens de dracht kan het verbruik van voer eventueel dagelijks worden gemeten. Na het werpen en tijdens de zoogtijd dient het verbruik van voer te worden gemeten op dezelfde dag als de nesten worden gewogen. De ouderdieren (P en F<sub>1</sub>) dienen te worden gewogen op de eerste dag dat zij de teststof krijgen toegediend en daarna eenmaal per week. Deze waarnemingen dienen voor elk volwassen dier afzonderlijk te worden vastgelegd.

De drachttijd dient te worden berekend vanaf dag nul van de dracht. Elke worp dient zo spoedig mogelijk na de geboorte te worden onderzocht ten einde het aantal en het geslacht van de jongen vast te stellen, alsmede het aantal dood- en levendgeboren jongen en de aanwezigheid van met het blote oog zichtbare afwijkingen.

Dode jongen en jongen die op de vierde dag worden gedood, dienen te worden bewaard en op mogelijke afwijkingen te worden onderzocht. De levende jongen moeten worden geteld en de nesten moeten worden gewogen op de ochtend na de geboorte, op de vierde en de zevende dag en vervolgens wekelijks tot het eind van het onderzoek, wanneer de dieren afzonderlijk dienen te worden gewogen. Bij de moederdieren of de nakomelingen waargenomen lichamelijke of gedragsafwijkingen dienen te worden opgetekend.

### Pathologie

#### Necropsie

Alle ouderdieren (P) en de volwassen dieren van de eerste generatie (F<sub>1</sub>) dienen te worden gedood wanneer zij voor de bepaling van reproductie-effecten niet langer nodig zijn. Nakomelingen van de eerste generatie die niet voor paring zijn geselecteerd, en alle nakomelingen van de tweede generatie dienen te worden gedood wanneer zij gespeend zijn.

Alle ouderdieren (P en F<sub>1</sub>) dienen, wanneer zij worden gedood of tijdens het onderzoek sterven, microscopisch te worden onderzocht op eventuele structurele afwijkingen of pathologische veranderingen, waarbij speciaal aandacht moet worden geschonken aan de organen van het voortplantingssysteem. Dode of stervende jongen dienen op afwijkingen te worden onderzocht.

### Histopathologie

Van alle voor paring geselecteerde P- en F<sub>1</sub>-dieren moeten de eierstokken, uterus, cervix, vagina, testes, epididymides, zaadblaasjes, coagulans afscheidende klier, de prostaat, hypofyse en aangetaste organen worden bewaard voor eventueel microscopisch onderzoek. In het geval dat deze organen nog niet bij andere onderzoeken waarbij herhaalde doseringen zijn toegediend zijn onderzocht, dienen zij microscopisch te worden onderzocht bij alle ouderdieren en dieren van de eerste generatie die voor paring zijn geselecteerd (zowel uit de hoogste dosisgroep als uit de controlegroep), alsmede bij de dieren die tijdens het onderzoek sterven. De organen die bij deze dieren afwijkingen vertonen, dienen bij dieren uit de andere dosisgroepen te worden onderzocht. In deze gevallen dienen alle weefsels die met het blote oog zichtbare pathologische veranderingen vertonen, microscopisch te worden onderzocht. Zoals hierboven reeds werd gesuggereerd, kunnen de voortplantingsorganen van dieren waarvan wordt vermoed dat zij onvruchtbaar zijn, aan een microscopisch onderzoek worden onderworpen.

## 2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het aantal drachtige dieren, de aard van de veranderingen en het percentage dieren dat elk type verandering vertoont.

Indien mogelijk, moeten de numerieke resultaten met behulp van een voor dit doel geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere algemeen erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

## 3. VERSLAGGEVING

### 3.1. Verslag van de proefnemingen

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- gebruikte diersoort/stam;
- gegevens over de toxische reactie naar geslacht en dosis, met inbegrip van vruchtbaarheid, dracht en levensvatbaarheid;
- tijdstip gedurende het onderzoek waarop de dood intreedt of aangeven of dieren tot het einde van de proef in leven bleven;
- tabel met het gewicht van elke worp, het gemiddelde gewicht van de jongen en het gewicht van elk jong afzonderlijk aan het eind van het onderzoek;
- toxische of andere effecten op de reproductie, het nageslacht, postnatale groei, enzovoort;
- dag waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en verloop hiervan;
- gegevens over het lichaamsgewicht van de ouderdieren en de dieren van de eerste generatie die voor paring zijn geselecteerd;
- bevindingen van de necropsie;
- gedetailleerde beschrijving van eventuele microscopische bevindingen;
- statistische verwerking van de resultaten, waar dat van toepassing is;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

### 3.2. Evaluatie en interpretatie

Zie algemene inleiding — Deel B.

## 4. LITERATUUR

Zie Algemene inleiding — Deel B.

---

### 1. METHODE

#### 1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

#### 1.2. Definities

Zie Algemene inleiding — Deel B.

#### 1.3. Referentiestoffen

Geen.

#### 1.4. Principe van de onderzoeksmethode

De teststof wordt langs een geschikte weg toegediend. Naar gelang van het doel van het onderzoek kan de stof in één enkele dosis of in, over een bepaalde periode herhaalde, doses aan een of meer groepen proefdieren worden toegediend. Daarna worden de teststof en/of metabolieten, afhankelijk van het soort onderzoek, bepaald in lichaamsvocht, weefsel en excreta.

Het onderzoek kan worden uitgevoerd met radioactief gemerkte of niet-gemerkte vormen van de teststof. Indien radioactiviteit wordt gebruikt, moet de radioactieve isotoop zodanig in de molecule van de stof zijn ingebouwd dat een maximum aantal gegevens over het metabolisme van de verbinding wordt verkregen.

#### 1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

#### 1.6. Beschrijving van de onderzoeksmethode

##### *Vorbereidingen*

Voor het onderzoek worden gezonde, jonge, volwassen dieren gedurende ten minste vijf dagen aan de laboratoriumomstandigheden gewend. Vóór het onderzoek worden de dieren op willekeurige wijze in de te behandelen groepen ingedeeld. In speciale omstandigheden kunnen zeer jonge, drachtige of van tevoren behandelde dieren worden gebruikt.

##### *Proefomstandigheden*

##### Proefdieren

Toxicokinetisch onderzoek kan op een of meer geschikte diersoorten worden uitgevoerd waarbij rekening moet worden gehouden met de soorten die zijn gebruikt of zullen worden gebruikt bij ander toxicologisch onderzoek van dezelfde teststof. Indien een knaagdier wordt gebruikt voor een test mag het gewicht niet meer dan  $\pm 20\%$  van het gemiddelde gewicht afwijken.

##### Aantal en geslacht

Voor onderzoek naar de absorptie en de uitscheiding zijn ten minste vier dieren in elke dosisgroep vereist. Er hoeft geen voorkeur te worden gegeven aan een bepaald geslacht, maar in sommige omstandigheden kan het nodig zijn beide geslachten te onderzoeken. Indien zich verschillen in reacties voordoen afhankelijk van het geslacht moeten vier dieren van elk geslacht worden getest. In het geval van onderzoek met niet-knaagdieren kan worden volstaan met een kleiner aantal dieren.

Indien de weefseldistributie wordt onderzocht, moet voor de grootte van de groep bij de aanvang van het onderzoek rekening worden gehouden met het aantal op elk tijdstip te doden dieren en het aantal te onderzoeken tijdstippen.

Indien het metabolisme wordt onderzocht, wordt de grootte van de groep bepaald door hetgeen voor het onderzoek nodig is.

Voor studies waarbij met meervoudige doseringen wordt gewerkt of waarbij op meerdere tijdstippen wordt onderzocht, dient voor de grootte van de groep rekening te worden gehouden met het aantal tijdstippen en het aantal te doden dieren, waarbij het aantal evenwel niet kleiner mag zijn dan twee. De groep moet voldoende groot zijn om de opname, het plateau en de eliminatie (als dat van toepassing is) van de teststof en/of metabolieten op aanvaardbare wijze te karakteriseren.

#### Dosisniveaus

Indien één enkele dosis wordt toegediend zijn ten minste twee dosisniveaus vereist. Er dient een lage dosis te worden gebruikt waarbij geen toxische effecten worden waargenomen en een hoge dosis waarbij zich toxische effecten of veranderingen in de toxicokinetische parameters voordoen.

Indien herhaalde dosering wordt toegepast, zal de lage dosis meestal volstaan, maar in bepaalde omstandigheden kan eveneens een hoge dosis noodzakelijk zijn.

#### Toedieningsweg

Voor toxicokinetische studies moet dezelfde toedieningsweg worden gebruikt en waar dat van toepassing is hetzelfde medium als gebruikt wordt of zal worden gebruikt voor het andere toxiciteitsonderzoek. De teststof wordt gewoonlijk oraal toegediend met behulp van een maagsonde of in het voer, aangebracht op de huid of gedurende bepaalde perioden aan groepen testdieren toegediend door inhalatie. Intraveneuze toediening kan nuttig zijn om de relatieve opname via de andere wegen te bepalen. Bovendien kan kort na de intraveneuze toediening van een stof nuttige informatie worden verkregen over het distributiepatroon.

Er dient rekening te worden gehouden met mogelijke interferenties van het medium met de teststof. Ook dient aandacht te worden gegeven aan verschillen in opname tussen de toediening van de teststof met behulp van een maagsonde en in het voer en aan de noodzaak om de dosis nauwkeurig te bepalen, met name wanneer de teststof in het voer wordt toegediend.

#### Observatieperiode

Alle proefdieren moeten dagelijks worden geobserveerd. Teken van toxiciteit en andere relevante klinische verschijnselen moeten samen met het tijdstip waarop deze voor het eerst zijn opgetreden, de mate en de duur ervan worden genoteerd.

#### Uitvoering

Nadat de proefdieren zijn gewogen, wordt de teststof via een geschikte weg toegediend. Indien dat belangrijk wordt geacht, kunnen de dieren voor het toedienen van de teststof worden gevestigd.

#### Absorptie

De opnamesnelheid en de opgenomen hoeveelheid van de toegediende stof kunnen aan de hand van verschillende methoden worden beoordeeld, met en zonder referentiegroep<sup>(1)</sup>, bij voorbeeld:

- bepaling van de hoeveelheid teststof en/of metabolieten in excreta, zoals urine, gal, uitwerpselen, uitgeademde lucht en in het karkas resterende stof;
- vergelijking van de biologische reactie (bij voorbeeld acute toxiciteitsstudies) tussen de proefgroep en controle- en/of referentiegroepen;
- vergelijking van de hoeveelheid via de nieren uitgescheiden stof en/of metabolieten in testgroep en referentiegroepen;
- bepaling van de oppervlakte onder de plasmaconcentratie/tijdcurve van de teststof en/of metabolieten en vergelijking met gegevens van een referentiegroep.

<sup>(1)</sup> In deze methode is een referentiegroep een groep waarbij de teststof via een andere weg wordt toegediend waarbij zeker is dat de dosis volledig wordt geresorbeerd.

## Distributie

Momenteel zijn twee methoden beschikbaar. Een ervan of beide kunnen worden gebruikt voor de analyse van distributiepatronen:

- met behulp van autoradiografie van het hele lichaam worden nuttige kwalitatieve gegevens verkregen,
- het doden van dieren op verschillende tijdstippen na de blootstelling en het bepalen van de concentratie en de hoeveelheid teststof en/of metabolieten in weefsels en organen leveren kwantitatieve gegevens.

## Uitscheiding

Bij uitscheidingsstudies worden urine, uitwerpselen en uitgeademde lucht en, in bepaalde gevallen, gal verzameld. De hoeveelheid teststof en/of metabolieten in deze excreta dient op diverse tijdstippen na blootstelling te worden gemeten totdat circa 95 % van de toegediende dosis is uitgescheiden of gedurende zeven dagen, wat zich het eerst voordoet.

In speciale gevallen kan het nodig zijn rekening te houden met de uitscheiding van de teststof in de melk van zogende proefdieren.

## Metabolisme

Ten einde de omvang en het patroon van het metabolisme van de teststof te bepalen, dienen de biologische monsters met behulp van geschikte technieken te worden geanalyseerd. Indien vragen uit voorafgaand toxicologisch onderzoek moeten worden opgelost, dient de moleculaire structuur van de metabolieten te worden gekarakteriseerd en moeten geschikte metabolismewegen worden voorgesteld. Het kan nuttig zijn onderzoek in vitro te verrichten om gegevens te verkrijgen over het metabolismepatroon.

Nadere gegevens over het verband tussen metabolisme en toxiciteit kunnen worden verkregen door biochemische studies, zoals het bepalen van effecten op de enzymesystemen die het metabolisme veroorzaken, uitputting van endogene niet-eiwit sulphydrylverbindingen en de binding van de stof aan macromoleculen.

## 2. GEGEVENS

Naargelang van het soort onderzoek dienen de gegevens in tabellen te worden samengevat en zoveel mogelijk te worden ondersteund met grafische voorstellingen. Voor elke testgroep dienen, wanneer dat van toepassing is, de gemiddelde en statistische variatie van metingen met betrekking tot tijd, dosering, weefsels en organen te worden vermeld. De mate van absorptie, de hoeveelheid en de snelheid van uitscheiding moeten met geschikte methoden worden bepaald. Wanneer onderzoek naar het metabolisme wordt verricht, dient de moleculaire structuur van de geïdentificeerde metabolieten te worden opgegeven en moeten eventuele metabolismewegen worden voorgesteld.

## 3. VERSLAGGEVING

### 3.1. Verslag van de proefneming

Naar gelang van het soort onderzoek moeten, indien mogelijk, in het verslag de volgende gegevens worden opgenomen:

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voer, enzovoort;
- kenmerken van de eventueel gebruikte gemerkte materialen;
- gebruikte dosisniveaus en intervallen;
- roedieningsweg(en) en eventueel gebruikt medium;
- waargenomen toxische en andere effecten;
- methoden voor het opsporen van de teststof en/of metabolieten in biologische monsters, met inbegrip van de uitgeademde lucht;
- rangschikking van metingen in tabelvorm naar geslacht, dosis, regime, tijdstip, weefsels en organen;

- gegevens over de mate van opname en uitscheiding in de tijd;
- methoden voor de omschrijving en opsporing van metabolieten in biologische monsters;
- methoden voor biologische metingen met betrekking tot het metabolisme;
- voorgestelde wegen voor metabolisme;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. **LITERATUUR**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

---

## „B.37 VERTRAAGDE NEUROTOXICITEIT VAN ORGANISCHE FOSFORVERBINDINGEN NA ACUTE BLOOTSTELLING

### 1. METHODE

#### 1.1. Inleiding

Bij de bepaling en evaluatie van de toxische effecten van stoffen is het van belang rekening te houden met het vermogen van sommige soorten stoffen om specifieke typen neurotoxiciteit te veroorzaken die niet met andere toxiciteitstesten kunnen worden aangetoond. Bij sommige organische fosforverbindingen is waargenomen dat vertraagde neurotoxiciteit optreedt; deze stoffen moeten worden beschouwd als kandidaten voor evaluatie.

Door screening in vitro kan worden nagegaan welke stoffen vertraagde polyneuropathie kunnen veroorzaken; negatieve uitkomsten vormen echter geen bewijs dat de teststof niet neurotoxisch is.

Zie ook de algemene inleiding deel B.

#### 1.2. Definities

*Organische fosforverbindingen* omvatten ongeladen organische esters, thioesters of anhydriden van organische fosforzuren, organische fosforzuren of organische fosforamidezuren of van verwante fosforthiozuren, fosforthiozuren of fosforthioamidezuren, of andere stoffen die de vertraagde neurotoxiciteit kunnen veroorzaken die soms bij stoffen uit deze klasse wordt waargenomen.

*Vertraagde neurotoxiciteit* is een syndroom dat gepaard gaat met het langdurig vertraagde begin van ataxie, distale axonopathieën in het ruggemerg en perifere zenuwen en inhibitie en veroudering van NTE (neuropathy target esterase) in zenuwweefsel.

#### 1.3. Referentiestoffen

Een referentiestof kan worden getest met een positieve controlegroep om aan te tonen dat de respons van geteste diersoorten onder laboratoriumomstandigheden niet significant is veranderd.

Een voorbeeld van een vaak toegepaste neurotoxicum is tri-o-tolylfosfaat (CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5, CAS-naam: fosforzuur, tris(2-methylfenyl)ester), ook bekend als tri-o-kresylfosfaat.

#### 1.4. Principe van de testmethode

De teststof wordt oraal in één enkele dosis toegediend aan hennen die, zo nodig, beschermd zijn tegen acute cholinerge effecten. De dieren worden gedurende 21 dagen geobserveerd op abnormaal gedrag, ataxie en verlamningsverschijnselen. Bij willekeurig geselecteerde hennen uit elke groep worden, gewoonlijk 24 en 48 uur na de toediening, biochemische bepalingen verricht, met name op inhibitie van NTE. Eenentwintig dagen na de toediening worden de resterende hennen gedood en wordt histopathologisch onderzoek verricht aan geselecteerd zenuwweefsel.

#### 1.5. Beschrijving van de testmethode

##### 1.5.1. Voorbereidingen

Gezonde jonge volwassen hennen die geen storende virusinfecties of medicatie hebben en die een normale gang vertonen worden aselekt verdeeld over behandelde en controlegroepen en ten minste gedurende vijf dagen voor de aanvang van het onderzoek geacclimatiseerd aan de laboratoriumomstandigheden.

De kooien of verblijven moeten zo ruim zijn, dat de hennen vrij kunnen bewegen en dat de gang van de dieren makkelijk kan worden waargenomen.

Het toedienen van de teststof gebeurt gewoonlijk langs orale weg door middel van een maagsonde, gelatinecapsules of een vergelijkbare methode. Vloeistoffen kunnen onverdund of opgelost in een geschikt vehiculum zoals maïsolie worden toegediend. Vaste stoffen moeten waar mogelijk worden opgelost omdat grote hoeveelheden vaste stof in gelatinecapsules mogelijk niet helemaal worden geresorbeerd. Van een niet-waterig vehiculum dienen de toxische eigenschappen bekend te zijn. Als dit niet zo is moeten deze voor de aanvang van de proef worden bepaald.

## 1.5.2. *Proefomstandigheden*

### 1.5.2.1. Proefdieren

Het gebruik van jonge volwassen leghennen (*Gallus gallus domesticus*) van 8-12 maanden wordt aanbevolen. Er moet gebruik worden gemaakt van rassen en stammen van normale grootte en de hennen moeten zijn gefokt onder omstandigheden die vrij beweging mogelijk maken.

### 1.5.2.2. Aantal en geslacht

Als aanvulling op de behandelde groep moet een controlegroep (vehiculum) en een positieve controlegroep worden gebruikt. De controlegroep (vehiculum) wordt op dezelfde wijze behandeld als de behandelde groep; alleen het toedienen van de teststof wordt achterwege gelaten.

Iedere groep vogels moet uit zoveel hennen bestaan dat er ten minste zes kunnen worden gedood voor biochemische bepalingen (telkens drie op twee tijdstippen) en zes de observatieperiode van 21 dagen kunnen overleven ten behoeve van pathologisch onderzoek.

Als positieve controle kan een gelijktijdig geobserveerde groep worden gebruikt of een groep uit een recent verricht onderzoek. De groep moet uit ten minste zes hennen bestaan die worden behandeld met een stof waarvan bekend is dat deze een vertraagd neurotoxische werking heeft. Drie hennen zijn bestemd voor biochemisch onderzoek en drie voor pathologisch onderzoek. Aangeraden wordt om gegevens uit eerdere onderzoeken periodiek aan te vullen. Als een essentieel onderdeel van de proef door het uitvoerend laboratorium wordt veranderd (bij voorbeeld stam, voedsel, behuizing), moeten nieuwe positieve controlegegevens worden ontwikkeld.

### 1.5.2.3. Dosisniveaus

Om het dosisniveau in het hoofdonderzoek vast te stellen moet een vooronderzoek worden verricht met een voldoende aantal hennen en dosisniveaugroepen. Er dient, om een juist dosisniveau voor de hoofdstudie te kunnen vaststellen, normaal gesproken enige mortaliteit op de treden in deze voorstudie. Om echter sterfte ten gevolge van acute cholinerge effecten te voorkomen, kan atropine of een ander preventief middel, waarvan bekend is dat het niet interfereert met vertraagde neurotoxische reacties, worden toegediend. Voor het vaststellen van de maximale niet-letale dosis van teststoffen kan een aantal verschillende methoden worden gebruikt (zie methode B.1bis). Gegevens uit eerdere onderzoeken bij de hen of andere toxicologische gegevens kunnen ook nuttig zijn bij de keuze van de dosis.

Het dosisniveau van de teststof in de hoofdstudie moet zo hoog mogelijk liggen, rekening houdend met de resultaten van de voorstudie en de bovengrens van 2 000 mg/kg lichaamsgewicht. Als er tussentijdse mortaliteit optreedt mag dit er niet toe leiden dat er te weinig proefdieren overblijven voor biochemisch (6) en pathologisch (6) onderzoek na 21 dagen. Ter voorkoming van sterfte door acute cholinerge effecten kan atropine of een ander preventief middel worden toegediend waarvan bekend is dat het niet interfereert met vertraagde neurotoxische reacties.

### 1.5.2.4. Limiettest

Als een test op een dosisniveau van ten minste 2 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag bij gebruikmaking van de beschreven procedures voor dit onderzoek geen waarneembare toxische effecten geeft en als dit, door gegevens van proeven met structureel verwante stoffen, ook niet verwacht mag worden, kan een onderzoek waarbij van een hogere dosering gebruik wordt gemaakt achterwege blijven. De limiettest is van toepassing tenzij blootstelling bij mensen een hogere dosering noodzakelijk maakt.

### 1.5.2.5. Observatieperiode

De observatieperiode dient 21 dagen te zijn.

## 1.5.3. *Procedure*

Na toediening van een preventief middel om sterfte ten gevolge van acute cholinerge effecten te voorkomen, wordt de teststof in één enkele dosis toegediend.

### 1.5.3.1. Algemene observatie

Het observeren moet onmiddellijk na het toedienen beginnen. Alle hennen moeten gedurende de eerste twee dagen enkele malen per dag worden geobserveerd en daarna ten minste eenmaal per dag over een periode van 21 dagen of totdat de dieren worden gedood. Alle tekenen van toxiciteit moeten worden geregistreerd, zoals tijdstip van aanvang, soort, ernst en duur van abnormaal gedrag. Ataxie moet worden gemeten op een schaalverdeling met ten minste vier niveaus en er moet worden gelet op verlamingsverschijnselen. De hennen die zijn geselecteerd voor pathologie moeten ten minste tweemaal per week uit de kooi worden genomen voor een periode van gedwongen motorische activiteit, zoals het beklimmen van een ladder, om het observeren van minimale toxische effecten te vergemakkelijken. Stervende dieren en dieren die hevige stress of pijn vertonen moeten, zodra dit wordt opgemerkt, worden verwijderd, op humane wijze worden gedood en worden geobduceerd.



### 1.5.3.2. Lichaamsgewicht

Alle dieren worden vlak voor het toedienen van de teststof en daarna minstens éénmaal per week gewogen.

### 1.5.3.3. Biochemie

Zes hennen die willekeurig uit iedere behandelde en vehiculumcontrolegroep worden gekozen en drie hennen uit de positieve controlegroep (als die tegelijkertijd wordt onderzocht) moeten binnen een paar dagen na toediening worden gedood. De hersenen en het lumbale ruggemerg worden geprepareerd en onderzocht op NTE-remmende effecten. Verder kan het nuttig zijn om weefsel van de nervus ischiadicus voor hetzelfde doel te prepareren en te onderzoeken. Meestal worden van de controlegroep en alle behandelde groepen na 24 uur drie vogels gedood en na 48 uur nog eens drie, terwijl de drie hennen van de positieve controlegroep na 24 uur worden gedood. Als de waarneming van klinische verschijnselen van toxiciteit (vaak op grond van het begin van cholinerge verschijnselen) er op duidt dat de toxische stof zeer langzaam wordt uitgescheiden, kan het aan te bevelen zijn om op twee tijdstippen tussen 24 uur en maximaal 72 uur na toediening weefsel van drie vogels te verzamelen.

Bepaling van acetylcholinesterase (AChE) kan ook bij deze monsters worden uitgevoerd als dat nodig lijkt. Er kan echter spontane reactivering van AChE in vivo optreden; dit kan leiden tot onderschatting van de remmende werking van de teststof op AChE.

### 1.5.3.4. Macroscopische necropsie

Bij macroscopische necropsie van alle (volgens plan of omdat ze stervend waren) gedode dieren moet onder meer het uiterlijk van de hersenen en het ruggemerg worden onderzocht.

### 1.5.3.5. Histopathologisch onderzoek

Zenuwweefsel van dieren die de observatieperiode hebben overleefd en niet gebruikt zijn voor biochemisch onderzoek, moet microscopisch worden onderzocht. Het weefsel moet in situ worden gefixeerd door perfusietechnieken. Andere andere moeten preparaten worden gemaakt van de kleine hersenen (ongeveer halverwege de lengte-as), het verlengde merg, het ruggemerg en perifere zenuwen. De preparaten van het ruggemerg moeten worden genomen uit het bovenste cervicaal segment, het midden van de thoracale regio en de lumbo-sacrale regio. Ook moeten er preparaten van het distale deel van de nervus tibialis, de vertakkingen hiervan naar de musculus gastrocnemius en van de nervus ischiadicus worden genomen. De preparaten moeten worden gekleurd met de juiste voor myeline en axonen specifieke kleurstoffen.

## 2. GEGEVENS

Indien negatieve resultaten worden behaald met betrekking tot de parameters van deze methoden (biochemie, histopathologie en gedragsobservatie) is in het algemeen verder testen op vertraagde neurotoxiciteit niet nodig. Bij onduidelijke of dubbelzinnige resultaten voor deze parameters kan verdere evaluatie nodig zijn.

Er moeten individuele gegevens worden verstrekt. Verder moeten alle resultaten in tabelvorm worden gepresenteerd, waarbij voor iedere testgroep het aantal dieren bij aanvang moet worden vermeld, het aantal dieren dat laesies of gedrags- of biochemische effecten vertoont, het soort en de ernst van deze laesies of effecten en het percentage dieren dat een bepaalde laesie of een bepaald effect in een bepaalde mate vertoont.

De bevindingen van dit onderzoek moeten worden geëvalueerd wat betreft het voorkomen, de ernst en de correlatie van gedrags-, biochemische en histopathologische effecten en ieder ander waargenomen effect bij de behandelde en de controlegroepen.

Numerieke resultaten moeten worden geïnterpreteerd met behulp van geschikte en algemeen geaccepteerde statistische methoden. De gebruikte statistische methoden moeten bij het ontwerp van het onderzoek worden gekozen.

3. **RAPPORTAGE**

**Verslag van de proefnemingen**

In het rapport moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

*proefdieren:*

- gebruikte stam;
- aantal en leeftijd van de dieren;
- herkomst, behuizing, enz.;
- individueel gewicht van de dieren bij het begin van de proef.

*Proefomstandigheden:*

- bijzonderheden over de bereiding van de teststof, de stabiliteit en homogeniteit, waar dat van toepassing is;
- motivering van de keuze van het vehiculum;
- bijzonderheden over de toediening van de teststof;
- bijzonderheden over voedsel en water;
- motivering van de dosiskeuze;
- specificatie van de toegediende doses, met inbegrip van bijzonderheden over het vehiculum, het volume en de fysische vorm van het toegediende materiaal;
- naam van het eventueel toegediende preventieve middel en gegevens over de wijze van toediening.

*Resultaten:*

- gegevens over het lichaamsgewicht;
- gegevens over de toxische respons, uitgesplitst naar groep, met inbegrip van de mortaliteit;
- aard, ernst en duur van de klinische observaties (al of niet reversibel);
- een gedetailleerde beschrijving van de biochemische methoden en bevindingen;
- necropsieverslagen;
- een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
- statistische bewerking van de resultaten, indien van toepassing.

*Bespreking van de resultaten.*

*Conclusies.*

4. **LITERATUUR**

Deze methode komt overeen met TG 418 van de OESO.

---

## B.38 VERTRAGDE NEUROTOXICITEIT VAN ORGANISCHE FOSFORVERBINDINGEN BIJ HERHAALDE TOEDIENING (28 DAGEN)

### 1. METHODE

#### 1.1. Inleiding

Bij de bepaling en evaluatie van de toxische effecten van stoffen is het van belang rekening te houden met het vermogen van sommige soorten stoffen om specifieke typen neurotoxiciteit te veroorzaken die niet met andere toxiciteitstesten kunnen worden aangetoond. Bij sommige organische fosforverbindingen is waargenomen dat vertraagde neurotoxiciteit optreedt; deze stoffen moeten worden beschouwd als kandidaten voor evaluatie.

Door screening in vitro kan worden nagegaan welke stoffen vertraagde polyneuropathie kunnen veroorzaken; negatieve uitkomsten vormen echter geen bewijs dat de teststof niet neurotoxisch is.

Deze 28-daagse test op vertraagde neurotoxiciteit geeft informatie over mogelijke gevaren voor de gezondheid die zich kunnen voordoen bij herhaalde blootstelling gedurende een beperkte tijd en over de relatie tussen dosis en respons. Tevens kan op grond van de test een schatting worden gemaakt van een dosis zonder waargenomen schadelijke effecten, hetgeen van nut kan zijn bij het vaststellen van veiligheidseisen bij blootstelling.

Zie ook de algemene inleiding deel B.

#### 1.2. Definities

*Organische fosforverbindingen* omvatten ongeladen organische esters, thioesters of anhydriden van organische fosforzuren, organische fosforzuren of organische fosforamidezuren of van verwante fosforthiozuren, fosforthiozuren of fosforthioamidezuren, of andere stoffen die de vertraagde neurotoxiciteit kunnen veroorzaken die soms bij stoffen uit deze klasse wordt waargenomen.

*Vertraagde neurotoxiciteit* is een syndroom dat gepaard gaat met het langdurig vertraagde begin van ataxie, distale axonopathieën in het ruggemerg en perifere zenuwen en inhibitie en veroudering van NTE (neuropathy target esterase) in zenuwweefsel.

#### 1.3. Principe van de testmethode

Aan hennen wordt dagelijks, gedurende 28 dagen, oraal een dosis van de teststof toegediend. De dieren worden tot 14 dagen na de laatste dosis tenminste eenmaal per dag geobserveerd op abnormaal gedrag, ataxie en verlamningsverschijnselen. Bij willekeurig geselecteerde hennen uit elke groep worden, gewoonlijk 24 en 48 uur na de laatste toediening, biochemische bepalingen verricht, met name op inhibitie van NTE. Twee weken na de laatste dosis worden de resterende hennen gedood en wordt histopathologisch onderzoek verricht aan geselecteerd zenuwweefsel.

#### 1.4. Beschrijving van de testmethode

##### 1.4.1. Voorbereidingen

Gezonde jonge volwassen hennen die geen storende virusinfecties of medicatie hebben en die een normale gang vertonen worden aselekt verdeeld over behandelde en controlegroepen en ten minste gedurende vijf dagen voor de aanvang van het onderzoek geacclimatiseerd aan de laboratoriumomstandigheden.

De kooien of verblijven moeten zó ruim zijn, dat de hennen vrij kunnen bewegen en dat de gang van de dieren makkelijk kan worden waargenomen.

Het toedienen van de teststof moet iedere dag plaatsvinden, zeven dagen per week, bij voorkeur door middel van een maagsonde of gelatinecapsules. Vloeistoffen kunnen onverdund of opgelost in een geschikt vehiculum zoals maisolie worden toegediend. Vaste stoffen moeten waar mogelijk worden opgelost omdat grote hoeveelheden vaste stof in gelatinecapsules mogelijk niet helemaal worden geresorbeerd. Van een niet-waterig vehiculum dienen de toxische eigenschappen bekend te zijn. Als dit niet zo is moeten deze voor de aanvang van de proef worden bepaald.

##### 1.4.2. Proefomstandigheden

###### 1.4.2.1. Proefdieren

Het gebruik van jonge volwassen leghennen (*Gallus gallus domesticus*), 8-12 maanden oud, wordt aanbevolen. Er moet gebruik worden gemaakt van gangbare rassen en stammen van normale grootte en de hennen moeten zijn gefokt onder omstandigheden die vrij bewegen mogelijk maken.

#### 1.4.2.2. Aantal en geslacht

In het algemeen moeten ten minste drie behandelde groepen en een controlegroep (vehiculum) worden gebruikt. De controlegroep (vehiculum) wordt op dezelfde wijze behandeld als de behandelde groep; alleen het toedienen van de teststof wordt achterwege gelaten.

Iedere groep vogels moet uit zoveel hennen bestaan dat er ten minste zes kunnen worden gedood voor biochemische bepalingen (telkens drie op twee tijdstippen) en zes de observatieperiode van 14 dagen na de behandeling kunnen overleven ten behoeve van pathologisch onderzoek.

#### 1.4.2.3. Dosisniveaus

De keuze dosisniveaus moet worden gemaakt met inachtneming van de resultaten van een acute test op vertraagde neurotoxiciteit en alle andere beschikbare gegevens over toxiciteit of kinetika van de teststof. Het hoogste dosisniveau moet gekozen worden met het doel toxische effecten te veroorzaken, bij voorkeur vertraagde neurotoxiciteit, zonder dat deze leiden tot sterfte of duidelijk lijden. Daarna moet een dalende reeks dosisniveaus gekozen worden om het verband tussen dosis en respons aan te tonen en bij het laagste niveau te komen tot een dosis zonder waargenomen schadelijke effecten.

#### 1.4.2.4. Limiettest

Als een test op een dosisniveau van ten minste 1000 mg/kg lichaamsgewicht/dag bij gebruikmaking van de beschreven procedures voor dit onderzoek geen waarneembare toxische effecten geeft en als dit, door gegevens van proeven met structureel verwante stoffen, ook niet verwacht mag worden, kan een onderzoek waarbij van een hogere dosering gebruik wordt gemaakt achterwege blijven. De limiettest is van toepassing tenzij de verwachte blootstelling bij mensen een hogere dosering noodzakelijk maakt.

#### 1.4.2.5. Observatieperiode

Alle dieren moeten ten minste eenmaal per dag worden geobserveerd gedurende de periode van blootstelling en 14 dagen daarna of totdat ze worden geobduceerd.

#### 1.4.3. Procedure

De teststof wordt gedurende een periode van 28 dagen dagelijks (zeven dagen per week) aan de proefdieren toegediend.

##### 1.4.3.1. Algemene observaties

Het observeren moet onmiddellijk na de eerste toediening beginnen. Alle hennen moeten gedurende de periode van 28 dagen waarop de stof wordt toegediend en gedurende 14 dagen daarna of totdat ze worden gedood, tenminste eenmaal per dag worden geobserveerd. Alle tekenen van toxiciteit moeten worden geregistreerd, zoals tijdstip van aanvang, soort, ernst en duur. Waarnemingen moeten onder meer, maar niet alleen, het observeren van abnormaal gedrag inhouden. Ataxie moet worden gemeten op een schaalverdeling met ten minste vier niveaus en er moet worden gelet op verlamingsverschijnselen. De hennen moeten ten minste tweemaal per week uit de kooi worden genomen voor een periode van gedwongen motorische activiteit, zoals het beklimmen van een ladder, om het observeren van minimale toxische effecten te vergemakkelijken. Stervende dieren die hevige stress of pijn vertonen moeten, zodra dit wordt opgemerkt, worden verwijderd, op humane wijze worden gedood en worden geobduceerd.

##### 1.4.3.2. Lichaamsgewicht

Alle dieren worden vlak voor het toedienen van de teststof en daarna minstens éénmaal per week gewogen.

##### 1.4.3.3. Biochemie

Zes hennen die willekeurig uit iedere behandelde en vehiculumcontrolegroep worden gekozen moeten binnen een paar dagen na toediening van de laatste dosis worden gedood. De hersenen en het lumbale ruggemerg worden geprepareerd en onderzocht op NTE-remmende effecten. Verder kan het nuttig zijn om weefsel van de nervus ischiadicus voor hetzelfde doel (NTE) te prepareren en te onderzoeken. Meestal worden van de controlegroep en alle behandelde groepen drie vogels 24 uur en drie vogels 48 uur na de laatste dosis gedood. Als gegevens van het acute onderzoek of andere (bij voorbeeld toxicokinetische) onderzoeken er op duiden dat het doden na de laatste dosis beter op een ander tijdstip kan gebeuren, dan moet dat tijdstip aangehouden worden en de motivering worden gedocumenteerd.

Bepaling van acetylcholinesterase (AChE) kan ook bij deze monsters worden uitgevoerd als dat nodig lijkt. Er kan echter spontane reactivering van AChE in vivo optreden; dit kan leiden tot onderschatting van de remmende werking van de teststof op AChE.

#### 1.4.3.4. Macroscopische necropsie

Bij macroscopische necropsie van alle (volgens plan of omdat ze stervend waren) gedode dieren moet onder meer het uiterlijk van de hersenen en het ruggemerg worden onderzocht.

#### 1.4.3.5. Histopathologisch onderzoek

Zenuwweefsel van dieren die de observatieperiode hebben overleefd en niet gebruikt zijn voor biochemisch onderzoek, moet microscopisch worden onderzocht. Het weefsel moet in situ worden gefixeerd door perfusietechnieken. Onder andere moeten preparaten worden gemaakt van de kleine hersenen (ongeveer halverwege de lengte-as), het verlengde merg, het ruggemerg en perifere zenuwen. De preparaten van het ruggemerg moeten worden genomen uit het bovenste cervicaal segment, het midden van de thoracale regio en de lumbo-sacrale regio. Ook moeten er preparaten van het distale deel van de nervus tibialis, de vertakkingen hiervan naar de musculus gastrocnemius en van de nervus ischiadicus worden genomen. De preparaten moeten worden gekleurd met de juiste voor myeline en axonen specifieke kleurstoffen. In eerste instantie moet microscopisch onderzoek worden verricht op de geprepareerde weefsels van alle dieren uit de controlegroep en de groep met de hoogste dosis. Als er aanwijzingen zijn voor effecten in de groep met de hoogste dosering, moeten ook dieren uit de groepen met lagere doseringen worden onderzocht.

## 2. GEGEVENS

Indien negatieve resultaten worden behaald met betrekking tot de parameters van deze methode (biochemie, histopathologie en gedragsobservatie) is in het algemeen verder testen op vertraagde neurotoxiciteit niet nodig. Bij onduidelijke of dubbelzinnige resultaten voor deze parameters kan verdere evaluatie nodig zijn.

Er moeten individuele gegevens worden verstrekt. Verder moeten alle resultaten in tabelvorm worden gepresenteerd, waarbij voor iedere testgroep moeten worden vermeld het aantal dieren bij aanvang, het aantal dieren dat laesies of gedrags- of biochemische effecten vertoont, het soort en de ernst van deze laesies of effecten en het percentage dieren dat een bepaalde laesie of een bepaald effect in een bepaalde mate vertoont.

De bevindingen van dit onderzoek moeten worden geëvalueerd wat betreft het voorkomen, de ernst en de correlatie van gedrags-, biochemische en histopathologische effecten en ieder ander waargenomen effect bij de behandelde en de controlegroepen.

Numerieke resultaten moeten worden geïnterpreteerd met behulp van geschikte en algemeen geaccepteerde statistische methoden. De te gebruiken statistische methoden moeten bij het ontwerp van het onderzoek worden gekozen.

## 3. RAPPORTAGE

### Verslag van de proefnemingen

In het rapport moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

#### *Proefdieren:*

- gebruikte stam;
- aantal en leeftijd van de dieren;
- herkomst, behuizing, enz.;
- individueel gewicht van de dieren bij het begin van de proef.

#### *Proefomstandigheden:*

- bijzonderheden over de bereiding van de teststof, de stabiliteit en homogeniteit, waar van toepassing;
- motivering van de keuze van het vehiculum;
- bijzonderheden over de toediening van de teststof;
- bijzonderheden over voedsel en water;
- motivering van de dosiskeuze;
- specificatie van de toegediende doses, met inbegrip van bijzonderheden over het vehiculum, het volume en de fysische vorm van het toegediende materiaal;
- motivering van de keuze van andere tijden voor de biochemische bepaling dan 24 en 48 uur.

*Resultaten:*

- gegevens over het lichaamsgewicht;
- gegevens over de toxische respons, uitgesplitst naar dosisniveau, met inbegrip van de mortaliteit;
- niveau waarop geen schadelijke effecten werden waargenomen (NOAEL);
- aard, ernst en duur van de klinische observaties (al dan niet reversibel);
- een gedetailleerde beschrijving van de biochemische methoden en bevindingen;
- necropsieverslagen;
- een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
- statistische bewerking van de resultaten, indien dit van toepassing is.

*Bespreking van de resultaten.*

*Conclusies.*

4. **LITERATUUR**

Deze methode komt overeen met TG 419 van de OESO.”

---

## „B.39. IN-VIVOTEST OP DNA-HERSTELSYNTHESE IN LEVERCELLEN VAN ZOOGDIEREN

### 1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 486 van de OESO: *In-vivotest op DNA-herstelsynthese in levercellen van zoogdieren* (1997).

#### 1.1. INLEIDING

De in-vivotest op DNA-herstelsynthese (unscheduled DNA synthesis — UDS) in levercellen van zoogdieren wordt gebruikt om te bepalen welke stoffen DNA-herstel in levercellen van behandelde dieren induceren (1)(2)(3)(4).

Deze in-vivotest maakt het mogelijk de genotoxische effecten van chemische stoffen in de lever te onderzoeken. Het gemeten eindpunt levert een indicatie op van de DNA-beschadiging en het herstel daarvan in levercellen. De lever is de plaats waar het metabolisme van geresorbeerde verbindingen zich meestal voor het grootste deel afspeelt en is derhalve een goede plaats om DNA-beschadiging in vivo te meten.

Als er aanwijzingen zijn dat de teststof niet in het doelweefsel terechtkomt, is deze test niet geschikt.

Het eindpunt van UDS wordt gemeten door bepaling van de opname van gelabelde nucleosiden in cellen waar geen geprogrammeerde DNA-synthese (in de S-fase) plaatsvindt. De meest gebruikte techniek is bepaling van de opname van met tritium gelabeld thymidine ( $^3\text{H}$ -TdR) met behulp van autoradiografie. Bij een in vivo UDS-test wordt bij voorkeur gebruikgemaakt van de rattenlever. Ook andere weefsels dan de lever kunnen worden gebruikt, maar daarvoor is deze methode niet geschikt.

De detectie van een UDS-respons is afhankelijk van het aantal DNA-basen dat op de beschadigde plaats wordt verwijderd en vervangen. De UDS-test is dan ook bijzonder geschikt voor de detectie van stoffen die leiden tot vervanging van grote stukken van 20-30 basen („longpatch repair“). De gevoeligheid bij de detectie van „shortpatch repair“, waarbij één tot drie basen worden vervangen, is daarentegen veel lager. Bovendien kunnen mutagene effecten een gevolg zijn van niet of verkeerd herstelde of verkeerd gerepliceerde DNA-beschadigingen. De intensiteit van de UDS-respons levert geen indicatie op omtrent de betrouwbaarheid van het herstelproces. Daarnaast is het mogelijk dat een mutagene stof met DNA reageert, maar dat de DNA-beschadiging niet via een excisieherstelproces wordt gerepareerd. De UDS-test levert dus niet veel specifieke informatie over een mutagene werking op, maar dit wordt gecompenseerd door de potentiële gevoeligheid van dit eindpunt omdat het in het hele genoom wordt gemeten.

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

#### 1.2. DEFINITIES

**Cel in herstel:** een cel met een hogere nettokernkorreling (NKK) dan een vooraf bepaalde waarde, waarvoor het laboratorium dat de test uitvoert een motivering moet geven.

**Nettokernkorreling:** een kwantitatieve maat voor de UDS-activiteit van cellen bij een UDS-test met autoradiografie, berekend door het gemiddelde aantal cytoplasmakorrels in kern-equivalente cytoplasmagebieden (CK) af te trekken van het aantal kernkorrels (KK):  $\text{NKK} = \text{NK} - \text{CK}$ . De NKK wordt per cel apart berekend en vervolgens samengevoegd voor cellen in een cultuur, in parallelle culturen, enz.

**DNA-herstelsynthese (unscheduled DNA synthesis — UDS):** herstelsynthese van DNA na excisie en verwijdering van een stuk DNA dat gedeeltelijk beschadigd is door een chemische stof of een fysisch agens.

#### 1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De in vivo UDS-test in levercellen van zoogdieren levert een indicatie op van de herstelsynthese van DNA na excisie en verwijdering van een stuk DNA dat gedeeltelijk beschadigd is door een chemische stof of een fysisch agens. Meestal is de test gebaseerd op de inbouw van  $^3\text{H}$ -TdR in het DNA van levercellen met een geringe frequentie van cellen in de S-fase van de celcyclus. De opname van  $^3\text{H}$ -TdR wordt meestal bepaald met behulp van autoradiografie, aangezien deze techniek niet zo gevoelig is voor storing door cellen in de S-fase als bijvoorbeeld vloeistofscintillatietelling.

## 1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

### 1.4.1. Voorbereiding

#### 1.4.1.1. Keuze van de diersoort

Meestal worden ratten gebruikt, maar in principe komt elke geschikte zoogdiersoort in aanmerking. Er dient gebruik te worden gemaakt van jonge gezonde volwassen dieren van in het laboratorium gangbare stammen. Bij het begin van de studie moet het gewichtsverschil tussen de dieren zo klein mogelijk zijn en mag dit maximaal  $\pm 20\%$  van het gemiddelde gewicht van elk geslacht bedragen.

#### 1.4.1.2. Huisvesting en voeding

De in de algemene inleiding van deel B genoemde algemene omstandigheden worden aangehouden, maar voor de luchtvochtigheid wordt gestreefd naar 50-60%.

#### 1.4.1.3. Voorbereiding van de dieren

Gezonde jonge volwassen dieren worden aselekt ingedeeld in de behandelde en controlegroepen. De kooien moeten zodanig worden geplaatst dat mogelijke effecten daarvan tot een minimum worden beperkt. De dieren krijgen een unieke identificatie en blijven voordat de test begint minimaal vijf dagen in hun kooi om in het laboratorium te acclimatiseren.

#### 1.4.1.4. Teststof/Bereiding

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspenderd en eventueel vóór de toediening aan de dieren worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks worden toegediend of vóór de toediening worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen van de teststof worden gebruikt.

### 1.4.2. Testomstandigheden

#### 1.4.2.1. Oplosmiddel/Medium

Het oplosmiddel/medium mag bij de gebruikte dosisniveaus geen toxische effecten veroorzaken en chemische reacties met de teststof moeten uitgesloten zijn. Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt.

#### 1.4.2.2. Controles

In elk onafhankelijk uitgevoerd deel van het experiment moeten tegelijkertijd positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles worden uitgevoerd. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren in de controlegroepen op identieke wijze worden behandeld als de dieren in de andere groepen.

Voor de positieve controles moet een stof worden gebruikt waarvan bekend is dat deze tot UDS leidt op een blootstellingsniveau waarbij een detecteerbare stijging ten opzichte van het achtergrondniveau kan worden verwacht. Wanneer voor een positieve controle metabole activering nodig is, moet de dosering zodanig worden gekozen dat de respons gematigd is (4). De doseringen kunnen zodanig worden gekozen dat de effecten duidelijk zijn maar de gecodeerde objectglaasjes niet onmiddellijk als zodanig herkenbaar zijn. Als positieve controle kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt:

Bemonsteringstijdstip	Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.
Vroeg (2-4 uur)	N-Nitrosodimethylamine	62-75-9	200-249-8
Laat (12-16 uur)	N-Fluoreen-2-ylacetaamide (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Ook andere geschikte stoffen kunnen als positieve controle worden gebruikt. Het is aanvaardbaar de positieve controle langs een andere weg toe te dienen dan de teststof.



## 1.5. UITVOERING

### 1.5.1. Aantal en geslacht van de dieren

Er moet een afdoende aantal dieren worden gebruikt om rekening te houden met de natuurlijke biologische variatie in de respons op de test. Elke groep moet minimaal drie analyseerbare dieren bevatten. Wanneer er een significant basisbestand met gegevens uit het verleden is opgebouwd, zijn er voor de gelijktijdige negatieve en positieve controlegroepen slechts één of twee dieren nodig.

Als er bij de uitvoering van de studie gegevens uit studies bij dezelfde soort en met dezelfde blootstellingsweg beschikbaar zijn waaruit blijkt dat er geen significante verschillen in toxiciteit tussen de geslachten zijn, is het voldoende de test bij één geslacht, bij voorkeur mannetjes, uit te voeren. Wanneer de blootstelling aan een chemische stof bij de mens door het geslacht wordt bepaald, zoals dit bijvoorbeeld bij sommige geneesmiddelen het geval is, moet de test bij dieren van het desbetreffende geslacht worden uitgevoerd.

### 1.5.2. Behandelingsschema

De teststof wordt in het algemeen in één behandeling toegediend.

### 1.5.3. Dosisniveaus

Normaal gesproken worden er ten minste twee dosisniveaus gebruikt. De hoogste dosis wordt gedefinieerd als de dosis die zodanige toxiciteitsverschijnselen veroorzaakt dat er bij hogere doses met hetzelfde doseringsschema waarschijnlijk sterfte zal optreden. In het algemeen wordt als laagste dosis 25-50% van de hoogste dosis gebruikt.

Stoffen met een specifieke biologische activiteit bij lage niet-toxische doses (zoals hormonen en mitogenen) kunnen een uitzondering vormen op deze criteria om de dosering te bepalen en moeten per geval worden beoordeeld. Als er een oriënterend onderzoek wordt uitgevoerd omdat er geen bruikbare gegevens beschikbaar zijn, moet dit in hetzelfde laboratorium gebeuren met dezelfde soort, dezelfde stam, hetzelfde geslacht en hetzelfde behandelingsschema als bij het hoofdonderzoek.

De hoogste dosis kan ook worden gedefinieerd als een dosis die enigerlei aanwijzing van toxiciteit in de lever oplevert (bv. pyknotische kernen).

### 1.5.4. Limiettest

Als een test met één dosis van minimaal 2 000 mg/kg lichaamsgewicht, in één keer of in twee porties op dezelfde dag toegediend, geen waarneembare toxische effecten veroorzaakt en op basis van gegevens over stoffen met een verwante structuur geen genotoxiciteit te verwachten valt, zal het wellicht niet nodig zijn een volledig onderzoek uit te voeren. Op grond van gegevens omtrent de verwachte blootstelling van de mens kan het gebruik van een hoger dosisniveau bij de limiettest nodig worden geacht.

### 1.5.5. Toediening van de doses

De teststof wordt meestal met behulp van een maagsonde of een geschikte intubatiecanule toegediend. Ook andere toedieningswegen kunnen aanvaardbaar zijn, als daarvoor een motivering kan worden gegeven. Intra-peritoneale toediening wordt echter niet aanbevolen, aangezien de lever dan rechtstreeks aan de teststof kan worden blootgesteld in plaats van via de bloedsomloop. Het maximale volume vloeistof dat in één keer met een sonde of injectie kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het proefdier. Het volume mag niet groter zijn dan 2 ml/100 g lichaamsgewicht. Voor het gebruik van grotere volumes moet een motivering worden gegeven. Behalve bij prikkelende of bijtende stoffen, die in hogere concentraties meestal heviger effecten veroorzaken, moeten volumeverschillen tot een minimum worden beperkt door de concentratie aan te passen, zodat op alle dosisniveaus hetzelfde volume kan worden gebruikt.

### 1.5.6. Levercelpreparaten

Normaal gesproken worden twaalf tot 16 uur na de toediening van de teststof levercelpreparaten van de behandelde dieren gemaakt. Meestal is ook een eerder bemonsteringstijdstip (normaal gesproken twee tot vier uur na de behandeling) nodig, tenzij er op twaalf tot 16 uur een duidelijke positieve reactie is. Er kunnen echter ook andere bemonsteringstijdstippen worden gebruikt, wanneer daarvoor op basis van toxicokinetische gegevens een motivering kan worden gegeven.

Meestal worden kortetermijnculturen van zoogdierlevercellen gemaakt door de lever in situ met collagenase te perfuseren en de net losgemaakte levercellen zich te laten hechten aan een geschikt oppervlak. De levercellen van dieren uit de negatieve controlegroep moeten een levensvatbaarheid (5) van ten minste 50% hebben

### 1.5.7. Bepaling van de UDS

Net geïsoleerde zoogdierlevercellen worden gedurende een geschikte periode, bijvoorbeeld drie tot acht uur, geïncubeerd met een medium dat meestal  $^3\text{H}$ -TdR bevat. Aan het eind van de incubatieperiode worden de cellen uit het medium verwijderd en kunnen ze vervolgens worden geïncubeerd met medium dat een overmaat ongelabeld thymidine bevat, om de niet ingebouwde radioactiviteit te verdrijven („cold chase“). De cellen worden vervolgens gespoeld, gefixeerd en gedroogd. Bij een langduriger incubatietijd zal de „cold chase“ wellicht niet nodig zijn. De objectglaasjes worden in autoradiografische emulsie gedoopt, in het donker belicht (bv. gekoeld gedurende zeven tot 14 dagen), ontwikkeld en gekleurd, waarna de belichte zilverkorrels worden geteld. Voor elk dier worden twee tot drie objectglaasjes geprepareerd.

### 1.5.8. Analyse

De geprepareerde objectglaasjes moeten voldoende cellen met een normale morfologie bevatten om een zinvolle bepaling van de UDS mogelijk te maken. De preparaten worden microscopisch onderzocht op tekenen van duidelijke cytotoxiciteit (bv. pyknose of een verlaagd gehalte aan het radioactieve isotoop).

De objectglaasjes worden vóór het tellen van de korrels gecodeerd. Normaal gesproken worden voor elk dier 100 cellen van ten minste twee objectglaasjes gescoord. Voor het scoren van minder dan 100 cellen per dier moet een motivering worden gegeven. Er worden geen korrels geteld bij cellen waarvan de kern in de S-fase is, maar het relatieve aantal cellen in de S-fase kan wel geregistreerd worden.

Met behulp van geschikte methoden wordt aan de hand van de neergeslagen zilverkorrels de hoeveelheid ingebouwd  $^3\text{H}$ -TdR in de kern en het cytoplasma van morfologisch normale cellen bepaald.

## 2. GEGEVENS

### 2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

De gegevens moeten voor elk objectglaasje en elk dier apart worden verstrekt. Daarnaast moet een overzicht van alle gegevens in tabelvorm worden gegeven. Voor elke cel, voor elk dier en voor elke dosis en tijd wordt de nettokernkorreling (NKK) berekend volgens de formule:  $\text{NKK} = \text{NK} - \text{CK}$ . Als het aantal „cellen in herstel“ wordt geteld, moet een motivering worden gegeven voor de criteria voor de definitie van „cel in herstel“ op basis van de resultaten bij in het verleden of tegelijkertijd uitgevoerde negatieve controles. De numerieke resultaten kunnen met behulp van statistische methoden worden geëvalueerd. Als statistische tests worden gebruikt, moeten deze vóór de uitvoering van het onderzoek worden gekozen en gemotiveerd.

### 2.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Criteria voor een positieve/negatieve respons zijn bijvoorbeeld:

- |          |     |  |
|----------|-----|--|
| Positief | i)  | NKK-waarden boven een vooraf bepaalde drempelwaarde die op basis van gegevens van het laboratorium uit het verleden wordt gemotiveerd: |
| of       | ii) | NKK-waarden die significant hoger zijn dan de gelijktijdige controle.  |
| Negatief | i)  | NKK-waarden binnen/onder de controledrempelwaarde uit het verleden:  |
| of       | ii) | NKK-waarden die niet significant hoger zijn dan de gelijktijdige controle.   |

Er moet naar de biologische relevantie van de gegevens worden gekeken. Daarbij moet bijvoorbeeld rekening worden gehouden met parameters als de spreiding over dieren, het verband tussen dosis en respons en de cytotoxiciteit. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt. Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn.

Hoewel de meeste experimenten duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt herhaald, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de UDS-test met levercellen van zoogdieren in vivo wijzen erop dat een teststof in vivo DNA-beschadigingen in levercellen van zoogdieren induceert, die in vitro door DNA-herstelsynthese kunnen worden gerepareerd. Negatieve resultaten wijzen erop dat de teststof onder de testomstandigheden geen DNA-beschadigingen induceert die met deze test kunnen worden gedetecteerd.

De waarschijnlijkheid dat de teststof in de grote bloedsomloop of specifiek het doelweefsel terechtkomt (systemische toxiciteit), dient te worden besproken.

### 3. **RAPPORTAGE**

#### TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Oplosmiddel/Medium:

- Motivering voor de keuze van het medium.
- Oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend.

Proefdieren:

- Gebruikte soort/stam.
- Aantal, leeftijd en geslacht van de dieren.
- Herkomst, huisvesting, voeding, enz.
- Het gewicht van elk dier aan het begin van de test, met vermelding van de spreiding, het gemiddelde en de standaardafwijking van het lichaamsgewicht voor elke groep.

Testomstandigheden:

- Positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles.
- Gegevens uit het oriënterende onderzoek, indien dit is uitgevoerd.
- Achtergrond voor de keuze van de dosisniveaus.
- Gegevens over de bereiding van de teststof.
- Gegevens over de toediening van de teststof.
- Achtergrond voor de keuze van de toedieningsweg.
- Methoden om na te gaan of de teststof in de grote bloedsomloop of het doelweefsel is terechtgekomen, indien van toepassing.
- Omrekening van de concentratie van de teststof in het voer/drinkwater (in ppm) in de feitelijke dosis (in mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing.
- Gegevens over de kwaliteit van het voer en het drinkwater.
- Een gedetailleerde beschrijving van het behandelings- en bemonsteringsschema.
- Methoden voor de meting van de toxiciteit.
- Methoden voor het kweken en prepareren van de levercellen.
- Gebruikte autoradiografietechniek.

- Aantal geprepareerde objectglaasjes en aantal gescoorde cellen.
- Criteria voor de beoordeling.
- Criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is.

Resultaten:

- Waarden voor de kernkorrels, de cytoplasmakorrels en de nettokernkorreling voor elk objectglaasje apart, gemiddeld voor elk dier en gemiddeld per groep.
- Indien beschikbaar het verband tussen dosis en respons.
- Eventuele statistische analyses.
- Teken van toxiciteit.
- Gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles.
- Gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles, met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking.
- Aantal „cellen in herstel”, indien bepaald.
- Aantal cellen in de S-fase, indien bepaald.
- Levensvatbaarheid van de cellen.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

#### 4. REFERENTIES

- (1) Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. and Penman, M.G. (1985). An Assessment of the In Vivo Rat Hepatocyte DNA Repair Assay. *Mutation Res.*, 156, pp. 1-18.
- (2) Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987); A Protocol and Guide for the In Vivo Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay. *Mutation Res.*, 189, pp. 123-133.
- (3) Kennelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell, I. de G. (1993); In Vivo Rat Liver UDS Assay. In: Kirkland D.J. and Fox M., (eds), *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised.* Cambridge University Press. Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.
- (4) Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C.A. and Mori, H. (1993). Recommendations for the Performance of UDS Tests In Vitro and In Vivo. *Mutation Res.*, 312, pp. 263-285.
- (5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the In Vivo/In Vitro DNA Repair Assay (UDS). *Mutation Res.*, 291, pp. 21-27.
- (6) Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.E. (1982). Detection of Genotoxic Carcinogens in the In Vivo/In Vitro Hepatocyte DNA Repair Assay. *Environ. Mutagen.*, 4, pp. 553-562.

1. **METHODE**

1.1. **Inleiding**

Twee in vitro-tests voor huidcorrosiviteit, de bepaling aan de hand van de transcutane elektrische weerstand (TEW) in rattenhuid en een test met een model van de humane huid, zijn door het Europees Centrum voor de validering van alternatieve methoden (ECVAM) van het Gemeenschappelijk Centrum voor onderzoek van de Europese Commissie als wetenschappelijk verantwoord bekrachtigd (1) (2) (3). Bij het valideringsonderzoek van het ECVAM is aangetoond dat met beide tests een betrouwbaar onderscheid kan worden gemaakt tussen stoffen waarvan bekend is dat ze corrosief c.q. niet-corrosief voor de huid zijn. Bovendien kon met het test-protocol op basis van het model van de humane huid een correct onderscheid worden gemaakt tussen stoffen met een meer of minder hevige corrosieve werking (stoffen waarvan bekend is dat ze ernstig corrosief voor de huid zijn, R35, en andere stoffen die corrosief voor de huid zijn, R34) (2). Voor beide tests wordt een beschrijving en een procedure vermeld; de keuze van de te gebruiken test wordt bepaald door de specifieke eisen en voorkeuren van de gebruiker.

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

1.2. **Definities**

*Huidcorrosie*: het ontstaan van onomkeerbare weefselschade in de huid na het aanbrengen van testmateriaal.

1.3. **Referentiestoffen**

Er worden geen referentiestoffen gespecificeerd, maar zie ook de punten 1.5.3.4 en 1.7.2.3.

1.4. **Principe van de testmethode — TEW-bepaling met rattenhuid**

Het testmateriaal wordt gedurende maximaal 24 uur aangebracht op het oppervlak van de epidermis van huidschijfjes die uit de huid van op humane wijze gedode jonge ratten worden genomen. Corrosief materiaal wordt gekenmerkt doordat het kan leiden tot een verlies van de normale integriteit en barrièrefunctie van het stratum corneum, dat wordt gemeten als een daling van de inherente TEW tot onder een drempelwaarde (5 kΩ) (4) (5). Irriterende en niet-irriterende materialen verlagen de TEW niet tot onder de drempelwaarde. Voor oppervlakteactieve stoffen en neutrale organische verbindingen (zie referentie (6) voor een definitie) kan in de testprocedure een kleurstofbindende stap worden opgenomen om te zorgen dat er specifiek met deze soorten chemische stoffen minder vals-positieve resultaten worden verkregen (2) (7).

1.5. **Beschrijving van de testmethode — TEW-bepaling met rattenhuid**

1.5.1. *Dieren*

Jonge (20-23 dagen) ratten (Wistar of een vergelijkbare stam) zijn nodig voor het prepareren van de huidschijfjes. Het haar op de rug en de flanken wordt met een kleine dierenchaar zorgvuldig verwijderd. De dieren worden vervolgens gewassen door zorgvuldig te wrijven terwijl het gebied wordt ondergedompeld in een antibioticaoplossing (die bijvoorbeeld streptomycine, penicilline, chlooramfenicol of amfotericine bevat met een concentratie die werkzaam is voor het remmen van de groei van bacteriën). De dieren worden op de derde of vierde dag na de eerste maal wassen opnieuw met antibiotica gewassen en binnen drie dagen gebruikt (de dieren mogen voor het prepareren van de huid niet ouder dan 31 dagen zijn).

1.5.2. *Het prepareren van de huidschijfjes*

De dieren worden op humane wijze gedood. Vervolgens wordt de huid van de rug van elk dier verwijderd en van overtollig vet ontdaan door het voorzichtig van de huid los te trekken. De huid wordt over het uiteinde van een PTFE-buis (polytetrafluoretheen) gelegd, waarbij ervoor wordt gezorgd dat het oppervlak van de epidermis in contact met de buis is. Een rubber „O”-ring wordt strak over het uiteinde van de buis geschoven om de huid op zijn plaats te houden en het overtollige weefsel wordt weggeknipt. In figuur 1 worden de afmetingen van de buis en de „O”-ring aangegeven. Vervolgens wordt de rubber „O”-ring zorgvuldig met vaseline aan de PTFE-buis vastgekit. De buis wordt met een klemring vastgezet in een houder die een magnesiumsulfaatoplossing (154 mM) bevat (figuur 2).

1.5.3. *Testprocedure*

1.5.3.1. *Aanbrengen van het testmateriaal*

Vloeibare teststoffen (150 µl) worden op het oppervlak van de epidermis in de buis aangebracht (figuur 2). Wanneer vast materiaal wordt getest, wordt een zodanige hoeveelheid van de vaste stof op het schijfje aangebracht, dat het hele oppervlak van de epidermis bedekt is. Vervolgens wordt gedeïoniseerd water (150 µl) boven op de vaste stof toegevoegd en worden de buizen voorzichtig geschud. De teststoffen moeten een maximaal contact met de huid hebben. Voor sommige vaste stoffen kan dit worden bereikt door ze te verwarmen tot 30°C om de stof te laten smelten of door ze fijn te malen om een korrelig materiaal of poeder te verkrijgen.

Voor elke teststof worden drie huidschijfjes gebruikt. De teststoffen worden gedurende 24 uur aangebracht (zie ook punt 1.5.3.4). De teststof wordt verwijderd door te spoelen onder een straal leidingwater van maximaal 30 °C tot er geen materiaal meer kan worden verwijderd. De verwijdering van teststoffen die in de buis gestold zijn, kan worden vergemakkelijkt door te spoelen onder een straal warm water van ongeveer 30 °C.

### 1.5.3.2. TEW-metingen

De TEW wordt gemeten met een wisselstroommeetbrug voor zwakstroom (bv. AIM 401 of 6401 of gelijkwaardig). Alvorens de elektrische weerstand te meten wordt de oppervlaktespanning van de huid verlaagd door zoveel 70%-ethanol toe te voegen dat de epidermis bedekt is. Na enkele seconden wordt de ethanol verwijderd door de buis om te keren en wordt het weefsel gehydrateerd door 3 ml magnesiumsulfaatoplossing (154 mM) toe te voegen. De elektroden van de meetbrug worden aan weerszijden van het huidschijfje geplaatst om de weerstand in kΩ te meten (zie figuur 2). De afmetingen van de elektrode en de lengte van het stuk elektrode dat onder de krokodillenklem uitkomt, zijn vermeld in figuur 1. De klem van de binnenste (dikke) elektrode rust tijdens de weerstandsmeting op de bovenkant van de PTFE-buis om ervoor te zorgen dat steeds een even lang stuk van de elektrode in de magnesiumsulfaatoplossing steekt. De buitenste (dunne) elektrode wordt zodanig in de houder aangebracht dat deze op de bodem rust. De afstand tussen de onderkant van de klemring en de onderkant van de PTFE-buis wordt constant gehouden (zie figuur 1), aangezien deze afstand de gemeten weerstand beïnvloedt.

Als de gemeten weerstand hoger is dan 20 kΩ, kan dit worden veroorzaakt doordat het oppervlak van de epidermis van het huidschijfje met een laag teststof bedekt is. Deze laag kan men trachten te verwijderen door bijvoorbeeld de PTFE-buis met de duim (met handschoen) dicht te houden en gedurende ongeveer 10 seconden te schudden. De magnesiumsulfaatoplossing wordt weggegooid en de weerstandsmeting wordt met verse magnesiumsulfaatoplossing herhaald.

De gemiddelde TEW-resultaten worden geaccepteerd, mits de tegelijkertijd gemeten positieve en negatieve controlewaarden binnen de voor de methode aanvaardbare marges vallen. Als controlestoffen en aanvaardbare weerstandsintervallen voor de beschreven methodologie en apparatuur worden voorgesteld:

Controle	Stof	Weerstandsinterval (kΩ)
Positief	10 M zoutzuur (36 %)	0,5-1,0
Negatief	Gedestilleerd water	10-25

### 1.5.3.3. Gewijzigde procedure voor oppervlakteactieve stoffen en neutrale organische verbindingen

Als de TEW van teststoffen die oppervlakteactieve stoffen of neutrale organische verbindingen zijn, lager is dan of gelijk is aan 5 kΩ, kan op de weefsels een bepaling van de kleurstofpenetratie worden uitgevoerd. Via deze procedure wordt bepaald of de resultaten vals-positief zijn (2).

#### 1.5.3.3.1. Aanbrenging en verwijdering van de kleurstof sulforhodamine B

Na de eerste behandeling met de teststof wordt 150 µl van een 10%-verdunding (g/v) van de kleurstof sulforhodamine B in gedestilleerd water gedurende twee uur aangebracht op het oppervlak van de epidermis van elk huidschijfje. De huidschijfjes worden vervolgens gedurende ongeveer 10 seconden onder een straal leidingwater van ten hoogste kamertemperatuur gespoeld om een eventuele overmaat of ongebonden kleurstof te verwijderen. Elk huidschijfje wordt voorzichtig van de PTFE-buis verwijderd en in een flesje (bv. een glazen scintillatieflesje van 20 ml) met gedecioniseerd water (8 ml) gelegd. De flesjes worden gedurende 5 minuten zachtjes geschud om eventueel nog resterende overmaat of ongebonden kleurstof te verwijderen. Daarna wordt deze spoelprocedure herhaald en vervolgens worden de huidschijfjes in flesjes met 5 ml 30% (g/v) natriumdodecylsulfaat (SDS) in gedestilleerd water gelegd en een nacht bij 60 °C geïncubeerd. Na incubatie wordt elk huidschijfje verwijderd en weggegooid en wordt de resterende oplossing gedurende 8 minuten bij 21 °C gecentrifugeerd (relatieve centrifugale kracht ~ 175). Vervolgens wordt 1 ml van het supernatans 1:5 (v/v) (d.w.z. 1 ml + 4 ml) verdund met 30% (g/v) SDS in gedestilleerd water. De optische dichtheid (OD) van de oplossing wordt bij ongeveer 565 nm gemeten.

#### 1.5.3.3.2. Berekening van het kleurstofgehalte

Het gehalte aan de kleurstof sulforhodamine B wordt berekend uit de OD-waarde (de molaire extinctiecoëfficiënt van de kleurstof sulforhodamine B bij 565 nm =  $8,7 \times 10^4$  en het molecuulgewicht = 580). Het gehalte aan de kleurstof sulforhodamine B wordt voor elk huidschijfje bepaald en vervolgens wordt voor de duplo's het gemiddelde kleurstofgehalte berekend. De gemiddelde resultaten voor de kleurstofbinding worden geaccepteerd, mits de tegelijkertijd gemeten controlewaarden binnen de voor de methode aanvaardbare marges vallen. Als aanvaardbare intervallen voor het kleurstofgehalte bij de controlestoffen en de beschreven methodologie en apparatuur worden voorgesteld:

Controle	Stof	Interval kleurstofgehalte (µg/schijfje)
Positief	10 M Zoutzuur (36 %)	40-100
Negatief	Gedestilleerd water	15-35

#### 1.5.3.4. Aanvullende informatie

De teststoffen kunnen ook gedurende een kortere periode (bv. 2 uur) op de huidschijfjes worden aangebracht om te bepalen of het materiaal sterk corrosief is. Bij het valideringsonderzoek is echter gebleken dat bij de TEW-bepaling voor verschillende teststoffen een te hoge corrosieve werking werd gevonden nadat ze gedurende 2 uur op de huidschijfjes waren aangebracht (2), terwijl na aanbrengen gedurende 24 uur op correcte wijze onderscheid kon worden gemaakt tussen corrosief en niet-corrosief.

De eigenschappen en afmetingen van de gebruikte testapparatuur en -procedure kunnen de gevonden TEW-waarden beïnvloeden. De corrosiedrempelwaarde van 5 kΩ is bepaald op grond van gegevens die met de specifieke hier beschreven apparatuur en procedure zijn verkregen. Het is mogelijk dat er bij significant gewijzigde testomstandigheden ook andere drempel- en controlewaarden van toepassing zijn. Daarom wordt aanbevolen de methodologie en de drempelwaarde voor de weerstand te kalibreren door een aantal referentiestandaards te testen die worden gekozen uit de chemische stoffen die bij het valideringsonderzoek zijn gebruikt (3).

#### 1.6. Principe van de testmethode — Bepaling met een model van de humane huid

Het testmateriaal wordt gedurende maximaal 4 uur plaatselijk aangebracht op een driedimensionaal model voor de humane huid, bestaande uit een gereconstrueerde epidermis met een functioneel stratum corneum. Corrosief materiaal wordt gekenmerkt doordat het bij gespecificeerde blootstellingsperiodes kan leiden tot een daling van de levensvatbaarheid van de cellen (die bijvoorbeeld wordt bepaald door de reductie van MTT te meten) tot onder gedefinieerde drempelwaarden. Het principe van de bepaling is gebaseerd op de hypothese dat stoffen corrosief zijn wanneer ze (door diffusie of erosie) het stratum corneum kunnen penetreren en voldoende cytotoxisch zijn om in de daaronder liggende cellen celdood te veroorzaken.

#### 1.7. Beschrijving van de testmethode — Bepaling met een model van de humane huid

##### 1.7.1. Modellen van de humane huid

Modellen van de humane huid kunnen van verschillende bronnen afkomstig zijn, maar ze moeten aan bepaalde criteria voldoen. Het model moet een functioneel stratum corneum hebben met daaronder een laag levende cellen. De barrièrefunctie van het stratum corneum moet afdoende zijn. Dit kan worden aangetoond door te demonstreren dat het model bestand is tegen cytotoxiciteit na de toediening van stoffen waarvan bekend is dat ze cytotoxisch zijn voor cellen maar die normaal gesproken het stratum corneum niet kunnen passeren. Er moet worden aangetoond dat het model onder gedefinieerde experimentele omstandigheden reproduceerbare resultaten oplevert.

De levensvatbaarheid van de levende cellen in het model moet zo hoog zijn dat er duidelijk onderscheid kan worden gemaakt tussen de positieve en negatieve controlestoffen. De levensvatbaarheid van de cellen (zoals die bijvoorbeeld wordt gemeten aan de hand van de reductie van MTT, d.w.z. een OD-waarde) na blootstelling aan de negatieve controlestof moet binnen aanvaardbare grenzen voor het specifieke model vallen. Evenzo moeten de waarden voor de levensvatbaarheid van de cellen met de positieve controlestof (in vergelijking met die voor de negatieve controle) binnen gespecificeerde grenzen liggen. Het belangrijkste is dat moet zijn aangetoond dat het gebruikte voorspellingsmodel aan internationale valideringsnormen voldoet (2).

##### 1.7.2. Testprocedure

###### 1.7.2.1. Aanbrengen van het testmateriaal

Voor vloeibaar materiaal moet zoveel teststof worden aangebracht dat het huidoppervlak bedekt is (minimaal 25 µl/cm<sup>2</sup>). Voor vast materiaal moet zoveel teststof worden aangebracht dat het huidoppervlak bedekt is en moet dit vervolgens worden bevochtigd om te zorgen voor een goed contact met de huid; indien nodig moeten vaste stoffen tot een poeder worden vernalen voordat ze worden aangebracht. Van de wijze van aanbrengen moet worden aangetoond dat deze voor een breed scala van chemische stoffen geschikt is (2). Aan het eind van de blootstellingsperiode moet het testmateriaal met een fysiologisch zoutoplossing zorgvuldig van het huidoppervlak worden gewassen.

###### 1.7.2.2. Meting van de levensvatbaarheid van de cellen

Voor de meting van de levensvatbaarheid van de cellen kan een willekeurige kwantitatieve gevalideerde methode worden gebruikt. De meest gebruikte bepaling is de reductie van MTT, waarvan is aangetoond dat deze in verschillende laboratoria nauwkeurige en reproduceerbare resultaten oplevert (2). Het huidschijfje wordt gedurende 3 uur bij 20-28 °C in een MTT-oplossing van 0,3 mg/ml gelegd. Er ontstaat een blauw formazan-neerslag dat vervolgens wordt geëxtraheerd (vloeistofextractie) en de formazanconcentratie wordt gemeten door de OD bij een golflengte tussen 545 en 595 nm te bepalen.

### 1.7.2.3. Aanvullende informatie

Het gebruikte huidmodel en het exacte protocol voor de blootstellingstijd, de spoelprocedures enz. hebben een grote invloed op de resultaten van de bepaling van de levensvatbaarheid van de cellen. Daarom wordt aanbevolen de methodologie en het voorspellingsmodel te kalibreren door een aantal referentiestandaards te testen die worden gekozen uit de chemische stoffen die bij het valideringsonderzoek van het ECVAM zijn gebruikt (3). Het is van fundamenteel belang dat wordt aangetoond dat de gebruikte methode voor een breed scala van chemische stoffen zowel binnen één laboratorium als voor verschillende laboratoria overeenkomstig de internationale normen reproduceerbaar is. De methode moet minimaal voldoen aan de reeds eerder vastgestelde criteria voor wetenschappelijk verantwoorde tests (2) en de resultaten van een dergelijk valideringsonderzoek moeten in een wetenschappelijk tijdschrift met intercollegiale toetsing („peer review“) worden gepubliceerd.

## 2. GEGEVENS

### 2.1. Behandeling van de resultaten

#### 2.1.1. TEW-bepaling met rattenhuid

De weerstand (in  $k\Omega$ ) voor het testmateriaal, de positieve en negatieve controles en eventuele standaardreferentiestoffen moeten in tabelvorm worden gerapporteerd, met vermelding van gegevens over duplobepalingen, herhaalde bepalingen, gemiddelden en de daaruit afgeleide indeling.

#### 2.1.2. Bepaling met een model van de humane huid

De OD-waarden en de berekende procentuele levensvatbaarheid van de cellen voor het testmateriaal, de positieve en negatieve controles en eventuele standaardreferentiestoffen moeten in tabelvorm worden gerapporteerd, met vermelding van gegevens over duplobepalingen, herhaalde bepalingen, gemiddelden en de daaruit afgeleide indeling.

### 2.2. Evaluatie en interpretatie van de resultaten

#### 2.2.1. TEW-bepaling met rattenhuid

Als de gemiddelde TEW voor de teststof hoger is dan  $5 k\Omega$ , is de stof niet corrosief. Als de TEW-waarde  $5 k\Omega$  of lager is en de teststof geen oppervlakteactieve stof of neutrale organische verbinding is, is de stof wel corrosief.

Voor oppervlakteactieve stoffen of neutrale organische verbindingen die een TEW van  $5 k\Omega$  of lager opleveren, kan een bepaling van de kleurstofpenetratie worden uitgevoerd. Als het gemiddelde kleurstofgehalte van het schijfje hoger is dan of gelijk is aan het tegelijkertijd bepaalde gemiddelde kleurstofgehalte van het schijfje met de positieve controle (36% HCl), is de teststof echt positief en derhalve corrosief. Als het gemiddelde kleurstofgehalte van het schijfje lager is dan het tegelijkertijd bepaalde gemiddelde kleurstofgehalte van het schijfje met de positieve controle (36% HCl), is de teststof vals-positief en derhalve niet corrosief.

#### 2.2.2. Bepaling met een model van de humane huid

De OD-waarde van de negatieve controle komt overeen met een levensvatbaarheid van de cellen van 100%, zodat de voor elk testmonster bepaalde OD-waarden kunnen worden gebruikt voor de berekening van een procentuele levensvatbaarheid in vergelijking met de negatieve controle. De grenswaarde van de procentuele levensvatbaarheid van de cellen die als scheiding tussen corrosieve en niet-corrosieve materialen (of tussen verschillende klassen van corrosiviteit) fungeert, moet in het voorspellingsmodel duidelijk worden gespecificeerd alvorens de methode wordt gevalideerd en vervolgens moet in het valideringsonderzoek worden aangetoond dat deze grenswaarde correct is (2).

## 3. RAPPORTAGE

### Testverslag

In het testverslag moet ten minste de volgende informatie worden opgenomen:

#### Teststof:

- gegevens over identificatie, fysisch karakter en indien van toepassing fysisch-chemische eigenschappen. Indien referentiestoffen worden gebruikt, moet ook daarover dergelijke informatie worden verstrekt.

#### Testomstandigheden:

- gedetailleerde informatie over de gebruikte testprocedure;
- een beschrijving en motivering van eventuele wijzigingen.



*Resultaten:*

- een tabel met de waarden voor de weerstand (TEW-bepaling) of de procentuele levensvatbaarheid van de cellen (bepaling met een model van de humane huid) voor het testmateriaal, de positieve en negatieve controles en eventuele standaardreferentiestoffen, met vermelding van gegevens over duplobepalingen, herhaalde bepalingen en gemiddelden;
- een beschrijving van eventuele andere waargenomen effecten.

*Bespreking van de resultaten.*

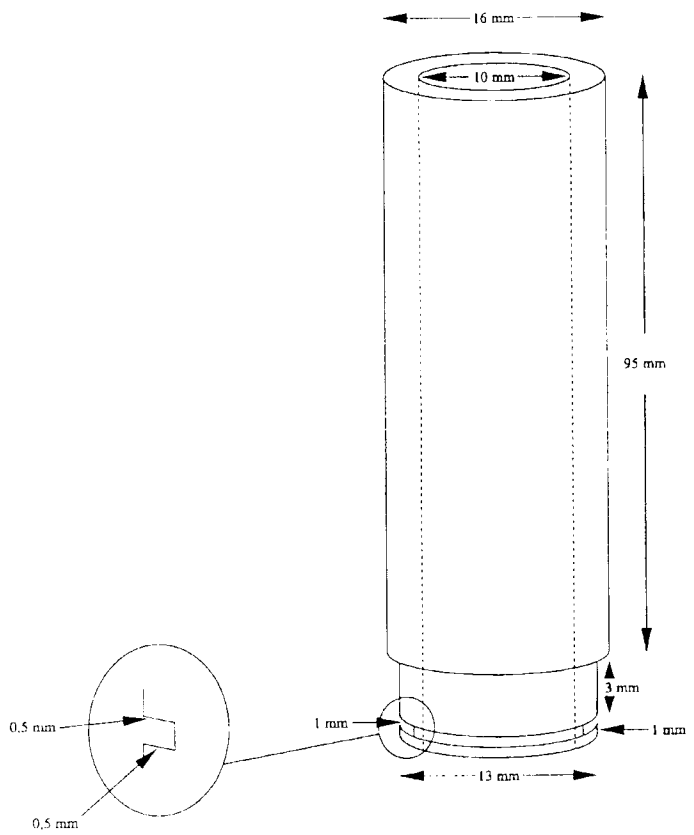
*Conclusies.*

4. **REFERENTIES**

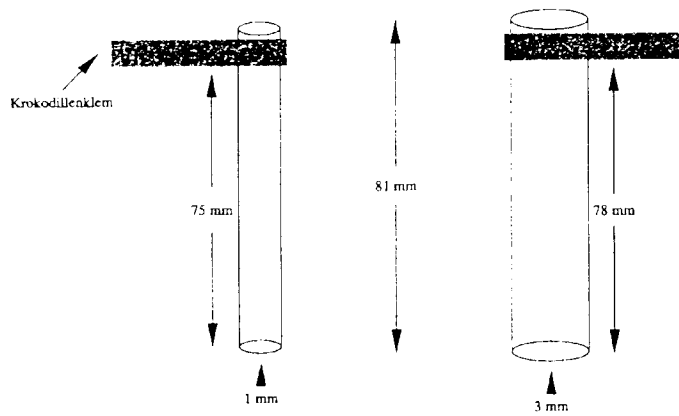
- (1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, *ATLA* 26, blz. 275-280.
- (2) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H-G. & Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, *Toxicology in Vitro* 12, blz. 483-524.
- (3) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. & Worth, A.P. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals, *Toxicology in Vitro* 12, blz. 471-482.
- (4) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. & Rhodes, C. (1986), An *in vitro* skin corrosivity test — modifications and validation, *Food & Chemical Toxicology* 24, blz. 507-512.
- (5) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J. & Gardner, J. (1992), The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial, *Toxicology in Vitro* 6, blz. 191-194.
- (6) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J. & Liebsch, M. (1998), An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion, *ATLA* 26, blz. 709-720.
- (7) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P. & Balls, M. (1995), A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6, *ATLA* 23, blz. 219-255.

Figuur 1

Afmetingen PTFE-buis

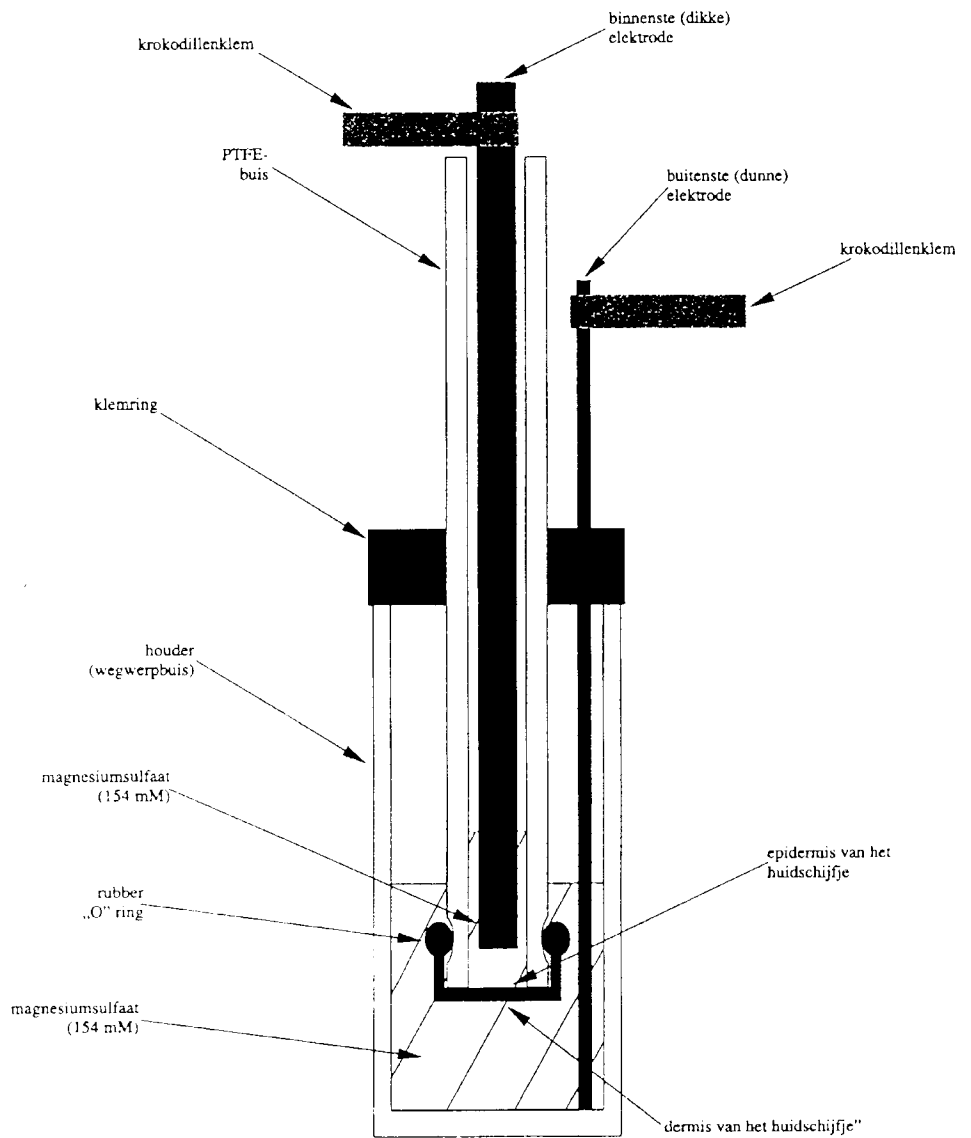


Afmetingen elektrode



Figuur 2

Apparatuur voor de TEW-bepaling bij rattenhuid



## 1. METHODE

### 1.1. Inleiding

Fototoxiciteit is gedefinieerd als een toxische respons die wordt opgewekt door de blootstelling van de huid aan bepaalde stoffen gevolgd door de blootstelling aan licht dan wel op vergelijkbare wijze wordt geïnduceerd door bestraling van de huid na systemische toediening van een stof.

Informatie die wordt verkregen met de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest, wordt gebruikt om het fototoxische potentieel van een onderzochte stof te bepalen, d.w.z. het al dan niet aanwezig zijn van mogelijke risico's die zijn verbonden aan een onderzochte stof in combinatie met de blootstelling aan UV en zichtbaar licht.

Aangezien het toxicologische eindpunt van de *in vitro*-test wordt gevormd door de bepaling van de fototoxiciteit die wordt geïnduceerd door de gecombineerde werking van een stof en licht, kunnen verbindingen die *in vivo* fototoxisch zijn na systemische aanbrenging en verdeling op de huid en verbindingen die na topische aanbrenging op de huid een foto-irriterend effect hebben, als zodanig worden herkend.

De *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest is van 1992-1997 ontwikkeld en gevalideerd in een gezamenlijk EU/Colipa-project (1) (2) (3) om een valide *in vitro*-alternatief te bieden voor de verschillende *in vivo* tests die werden gebruikt. In 1996 werd door een OESO-workshop aanbevolen om voor de bepaling van de fototoxiciteit een stapsgewijze *in vitro*-testprocedure te volgen (4).

Resultaten van de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest zijn vergeleken met acute fototoxiciteits- en foto-irritatie-effecten *in vivo* bij dieren en mensen, waarbij is gebleken dat de test deze effecten uitstekend voorspelt. De test is niet ontworpen om andere nadelige effecten te voorspellen die kunnen optreden bij de gecombineerde blootstelling aan een stof en licht, d.w.z. fotogenotoxiciteit, fotoallergie en fotocarcinogeniciteit, hoewel veel stoffen die deze specifieke eigenschappen hebben bij de *in vitro* 3T3 RU fototoxiciteitstest een positieve reactie zullen opleveren. Evenmin is de test bedoeld om de fototoxische potentie te kwantificeren.

Een stapsgewijze procedure voor de uitvoering van fototoxiciteitstests is in het aanhangsel geschetst.

### 1.2. Definities

*Bestralingssterkte*: de intensiteit van het ultraviolette (UV) of zichtbare licht dat op een oppervlak valt, uitgedrukt in  $W/m^2$  of  $mW/cm^2$ .

*Lichtdosis*: de hoeveelheid (= intensiteit  $\times$  tijd) ultraviolette (UV) of zichtbare straling die op een oppervlak valt, uitgedrukt in joules (=  $W \times s$ ) per oppervlakte-eenheid, d.w.z.  $J/m^2$  of  $J/cm^2$ .

*UV-golflengtebanden*: de door de CIE (Commission Internationale de L'Éclairage) aanbevolen indeling is: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) en UVC (100-280 nm). Er worden ook andere indelingen gehanteerd: de grens tussen UVB en UVA wordt vaak op 320 nm gelegd en UVA wordt soms onderverdeeld in UV-A1 en UV-A2, waarbij de grens ligt op ongeveer 340 nm.

*Levensvatbaarheid van cellen*: parameter waarmee de totale activiteit van een celpopulatie wordt aangegeven (d.w.z. opname van de vitale kleurstof neutraalrood in cellulaire lysosomen) die, afhankelijk van het gemeten eindpunt en de opzet van de test, is gecorreleerd met het totale aantal en/of de vitaliteit van de cellen.

*Relatieve levensvatbaarheid van cellen*: levensvatbaarheid van cellen uitgedrukt in verhouding tot negatievecontrolecellen (oplosmiddel) die tijdens de gehele testprocedure worden meegenomen, al dan niet met UV bestraald, maar niet met een onderzochte stof behandeld.

*Voorspellend model*: een algoritme om de resultaten van een toxiciteitstest om te zetten in een voorspelling van het toxische potentieel. In de hier beschreven test kunnen PIF en MPE worden gebruikt om de resultaten van de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest om te zetten in een voorspelling van het fototoxische potentieel.

*PIF (foto-irritatiefactor)*: een factor die wordt verkregen door twee even effectieve cytotoxische concentraties ( $EC_{50}$ ) van de onderzochte stof te vergelijken die zijn bepaald zonder (-UV) en met (+UV) een niet-cytotoxische bestraling met UVA/zichtbaar licht.

*MPE (gemiddeld foto-effect)*: een nieuwe parameter die wordt bepaald aan de hand van een wiskundige analyse van de volledige vorm van twee concentratieresponskrommen die zijn verkregen zonder (-UV) en met (+UV) een niet-cytotoxische bestraling met UVA/zichtbaar licht.

**Fototoxiciteit:** een acute toxische respons die wordt opgewekt door de blootstelling van de huid aan bepaalde stoffen gevolgd door de blootstelling aan licht of op vergelijkbare wijze wordt geïnduceerd door bestraling van de huid na systemische toediening van een stof.

**Foto-irritatie:** een begrip dat deel uitmaakt van de term „fototoxiciteit” en dat wordt gebruikt om alleen die fototoxische reacties te beschrijven die de huid vertoont na de blootstelling aan stoffen (topisch of oraal). Deze fototoxische reacties leiden altijd tot specifieke celbeschadiging (zonnebrandachtige reacties).

**Fotoallergie:** een verworven immunologische reactie die niet optreedt bij een eerste blootstelling aan een stof en licht, maar een inductieperiode van één of twee weken nodig heeft voordat een reactie van de huid kan worden aangetoond.

**Fotogenotoxiciteit:** een genotoxische respons die wordt waargenomen op een genetisch eindpunt en wordt opgewekt door de blootstelling van cellen aan een niet-genotoxische dosis UV/zichtbaar licht en een niet-genotoxische stof.

**Fotocarcinogeniteit:** carcinogeniteit die wordt geïnduceerd door herhaalde blootstelling aan licht en een chemische stof. De term „foto-cocarcinogenese” wordt gebruikt als door UV geïnduceerde tumorvorming wordt versterkt door een chemische stof.

### 1.3. Referentiestoffen

Behalve de positieve controlestof chloorpromazine, die in elke proef parallel moet worden getest, wordt aanbevolen voor het opzetten van de 3T3 NRU fototoxiciteitstest als referentiestoffen gebruik te maken van een aantal van de stoffen die bij deze test in interlaboratoriumproeven zijn gebruikt (1) (3) (13).

### 1.4. Achtergrond

Van veel typen stoffen zijn fototoxische effecten gemeld (5) (6) (7) (8). De enige gemeenschappelijke eigenschap is hun vermogen om lichtenergie te absorberen in het zonlichtgebied. Volgens de eerste wet van de fotochemie (wet van Grothaus-Draper) is de voorwaarde voor het optreden van een fotoreactie dat er voldoende lichtkwanta worden geabsorbeerd. Voordat wordt overwogen een biologische test volgens de onderhavige methode uit te voeren, moet dan ook een absorptiespectrum van de te onderzoeken stof in het UV/zichtbare licht worden bepaald (bv. volgens OESO-testrichtlijn 101). Als de molaire extinctieabsorptiecoëfficiënt minder is dan  $10 \text{ liter} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ , heeft de stof geen fotoreactief potentieel en hoeft deze niet volgens de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest of een andere biologische test te worden getest op nadelige fotochemische effecten (aanhangsel).

### 1.5. Principe van de testmethode

Er zijn vier mechanismen bekend voor een fototoxische respons als gevolg van de absorptie van licht door een (chemische) chromofoor (7). Deze kunnen alle leiden tot celbeschadiging. Daarom is de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest gebaseerd op een vergelijking van de cytotoxiciteit van een stof met en zonder de blootstelling aan een niet-cytotoxische dosis UVA/zichtbaar licht. De cytotoxiciteit wordt in deze test uitgedrukt als de concentratieafhankelijke verlagings van de opname van de vitale kleurstof neutraalrood (NR) (9) 24 uur na de behandeling met de te onderzoeken stof en bestraling.

Balb/c 3T3 cellen worden gedurende 24 uur in cultuur gehouden zodat zich een monocellulaire laag vormt. Vervolgens worden voor elke te onderzoeken stof twee 96-wells-platen gedurende één uur gepreïncubeerd met acht verschillende concentraties van de stof. Daarna wordt één van de twee platen blootgesteld aan een niet-cytotoxische dosis UVA/zichtbaar licht van  $5 \text{ J/cm}^2$  UVA (+UV-experiment) terwijl de andere plaat in het donker wordt bewaard (-UV-experiment). In beide platen wordt het behandelingsmedium vervolgens vervangen door cultuurmedium en na nog eens 24 uur incubatie wordt de levensvatbaarheid van de cellen bepaald aan de hand van de opname van neutraalrood (NRU — neutral red uptake) gedurende drie uur. De relatieve levensvatbaarheid van de cellen, uitgedrukt als percentage van de levensvatbaarheid van onbehandelde negatieve controles, wordt voor elk van de acht testconcentraties berekend. Om een uitspraak te doen over het fototoxische potentieel worden de concentratieresponsen die zijn verkregen met (+UV) en zonder (-UV) bestraling vergeleken, gewoonlijk op het  $\text{EC}_{50}$  niveau, d.w.z. de concentratie die de levensvatbaarheid van de cellen met 50% vermindert ten opzichte van onbehandelde controles.

### 1.6. Kwaliteitscriteria

**UVA-gevoeligheid van de cellen, historische gegevens:** de cellen moeten regelmatig worden gecontroleerd op gevoeligheid voor UVA. Cellen worden overgeënt met de dichtheid die wordt gebruikt in de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest, de volgende dag bestraald met UVA-doses van  $1-9 \text{ J/cm}^2$  en de levensvatbaarheid van de cellen wordt één dag later bepaald door middel van de NRU-test. Cellen voldoen aan de kwaliteitscriteria als hun levensvatbaarheid na bestraling met  $5 \text{ J/cm}^2$  UVA ten minste 80% bedraagt van de levensvatbaarheid van de niet-belichte controles. Bij de hoogste UVA-dosis van  $9 \text{ J/cm}^2$  mag de levensvatbaarheid niet minder zijn dan 50% van die van de niet-belichte controles. Deze controle dient ongeveer om de tien celpassages te worden herhaald.

**UVA-gevoeligheid van de negatievecontrolecellen, lopende test:** de test voldoet aan de kwaliteitscriteria als negatieve controles (cellen in EBSS (Earl's balanced salt solution) met of zonder 1% dimethylsulfoxide (DMSO) of 1% ethanol (EtOH)) in het +UVA-experiment een levensvatbaarheid vertonen van ten minste 80% van die van niet-bestraalde cellen in hetzelfde oplosmiddel in het parallel uitgevoerde niet-belichte experiment (-UVA).

*Levensvatbaarheid van negatievecontrolecellen:* de absolute optische dichtheid ( $OD_{540\text{ NRU}}$ ) die wordt gemeten in het NR-extract van de negatieve controles laat zien of de  $1 \times 10^4$  cellen die per well zijn overgeënt tijdens de twee dagen van de test met de normale verdubbelingstijd zijn gegroeid. Een test voldoet aan de goedkeuringscriteria als de gemiddelde  $OD_{540\text{ NRU}}$  van onbehandelde controles  $\geq 0,2$  is.

*Positieve controle:* parallel aan elke *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest moet een bekende fototoxische stof worden getest. Chloorpromazine (CPZ) is als positieve controle gebruikt in de EU/Colipa-valideringsstudie en wordt daarom aanbevolen. Voor CPZ dat wordt getest volgens het standaardprotocol in de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest, zijn de volgende goedkeuringcriteria gedefinieerd: CPZ bestraald (+UVA):  $EC_{50} = 0,1$  tot  $2,0\ \mu\text{g/ml}$ . CPZ niet-bestraald (-UVA):  $EC_{50} = 7,0$  tot  $90,0\ \mu\text{g/ml}$ . De foto-irritatiefactor (PIF), d.w.z. de verschuiving van  $EC_{50}$  moet ten minste 6 zijn.

In plaats van CPZ kunnen ook andere bekende fototoxische stoffen die geschikt zijn wat betreft de chemicaliënklasse of de oplosbaarheids eigenschappen van de onderzochte stof, als parallele positieve controle worden gebruikt. In dit geval dienen de bereiken van de  $EC_{50}$  waarden en PIF of MPE (gemiddeld foto-effect) uitgaande van historische gegevens op adequate wijze gedefinieerd te zijn als aanvaardbaarheids criteria voor de test.

## 1.7. Beschrijving van de testmethode

### 1.7.1. Voorbereidingen

#### 1.7.1.1. Cellen

In de valideringsstudie is een permanente fibroblastcellijn van muizen — Balb/c 3T3, kloon 31 — van ATCC of ECACC gebruikt. Deze wordt daarom aanbevolen. Andere cellen of cellijnen kunnen met succes volgens hetzelfde testprotocol worden gebruikt als de culturomstandigheden worden aangepast aan de specifieke behoeften van de cellen, maar de gelijkwaardigheid moet worden aangetoond.

De cellen moeten regelmatig worden gecontroleerd op de afwezigheid van mycoplasma besmetting en mogen alleen worden gebruikt als de resultaten van die controle bevredigend zijn.

Aangezien de UVA-gevoeligheid van cellen kan toenemen met het aantal passages, moeten Balb/c 3T3 cellen met het laagste verkrijgbare passagegetal worden gebruikt, bij voorkeur lager dan 100. Het is belangrijk dat de UVA-gevoeligheid van de Balb/c 3T3 cellen regelmatig wordt gecontroleerd volgens de kwaliteitscontroleprocedure die in dit document is beschreven.

#### 1.7.1.2. Media en culturomstandigheden

Voor routinematige passage van de cellen en tijdens de testprocedure moeten geschikte cultuurmedia en incubatieomstandigheden worden gebruikt. Voor Balb/c 3T3 cellen zijn dit DMEM gesupplementeerd met 10% serum van pasgeboren kalveren, 4 mM glutamine, penicilline en streptomycine en incubatie onder vochtige omstandigheden bij  $37^\circ\text{C}/7,5\% \text{CO}_2$ . Het is vooral belangrijk dat de culturomstandigheden zo zijn dat de celdyctijd binnen het normale gedocumenteerde bereik van de gebruikte cellen of cellijn ligt.

#### 1.7.1.3. Prepareren van de culturen

Cellen uit ingevroren voorraadculturen worden met een geschikte dichtheid overgeënt in cultuurmedium en ten minste één maal in subcultuur gebracht voordat zij in de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest worden gebruikt.

Voor de fototoxiciteitstest worden testcellen overgeënt in een cultuurmedium, waarbij de dichtheid zo is dat de culturen geen confluente bereiken voor het einde van de test, d.w.z. wanneer de levensvatbaarheid van de cellen wordt bepaald 48 uur na het overenten van de cellen. Voor Balb/c 3T3 die worden gekweekt in 96-wells-platen, wordt een celdichtheid van  $1 \times 10^4$  cellen per well aanbevolen.

Voor elke te onderzoeken stof worden cellen op identieke wijze overgeënt op twee afzonderlijke 96-wells-platen die vervolgens parallel de gehele testprocedure onder identieke culturomstandigheden doorlopen, met uitzondering van de tijd gedurende welke een van de platen wordt bestraald (+UVA/zichtbaar licht) en de andere in het donker wordt bewaard (-UVA/zichtbaar licht).

#### 1.7.1.4. Metabolische activering

Hoewel het gebruik van metaboliserende systemen een algemene voorwaarde is voor alle *in vitro* tests voor de voorspelling van genotoxisch en carcinogeen potentieel, is tot dusverre voor fototoxicologie geen stof bekend die pas na metabolische transformatie *in vivo* of *in vitro* als fototoxine werkt. Het wordt dan ook niet nodig geacht, en evenmin zijn er wetenschappelijke gronden, om de huidige test uit te voeren met een metabolisch activeringssysteem.

### 1.7.1.5. Te onderzoeken stof/preparatie

Te onderzoeken stoffen moeten vlak voor het gebruik vers worden geprepareerd, tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is. Prepareren onder rood licht kan nodig zijn als het waarschijnlijk is dat snelle fotodegradatie optreedt.

Te onderzoeken stoffen moeten worden opgelost in gebufferde zoutoplossingen, bijvoorbeeld Earl's balanced salt solution (EBSS) of fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS), die om interferentie tijdens de bestraling te voorkomen, vrij moeten zijn van proteïnecomponenten en lichtabsorberende pH-indicatorkleurstoffen.

Te onderzoeken stoffen met een beperkte oplosbaarheid in water moeten in geschikte oplosmiddelen worden opgelost met een concentratie die 100-maal de gewenste eindconcentratie is en vervolgens met de gebufferde zoutoplossing een factor 100 worden verdund. Als er een oplosmiddel wordt gebruikt, moet dit in alle culturen met een constant volumegehalte van 1% (v/v) aanwezig zijn, d.w.z. zowel in de negatieve controles als in alle concentraties van de te onderzoeken stof.

De aanbevolen oplosmiddelen zijn dimethylsulfoxide (DMSO) en ethanol (EtOH). Andere oplosmiddelen met een lage cytotoxiciteit (bv. aceton) kunnen in aanmerking komen, maar zij moeten zorgvuldig worden onderzocht op specifieke eigenschappen, bijvoorbeeld reactie met de te onderzoeken stof, onderdrukking van het fototoxische effect, vermogen om radicalen te binden.

Om het oplossen te bevorderen kan gebruik worden gemaakt van vortex-menging en/of sonificatie en/of verwarming tot 37°C.

### 1.7.1.6. UV bestraling/preparatie

*Lichtbron:* de keuze van een geschikte lichtbron en geschikte filtering is de meest cruciale factor bij fototoxiciteitstests. UVA en zichtbaar licht worden gewoonlijk geassocieerd met fotosensibilisatie (7) (10), terwijl UVB van minder belang is en rechtstreeks hoogcytotoxisch is waarbij de cytotoxiciteit van 313 nm tot 280 nm een factor 1000 toeneemt (11). Bij de keuze van een geschikte lichtbron geldt de essentiële eis dat de lichtbron golflengten uitzendt die door de te onderzoeken stof worden geabsorbeerd en dat de lichtdosis (die binnen een redelijke tijd kan worden bereikt) voldoende is om bekende fotosensitizers te detecteren. Bovendien mogen de gebruikte golflengtes en doses, met inbegrip van de emissie van warmte (infrarood), geen ontoelaatbare schade berokkenen aan het testsysteem.

Simulatie van zonlicht met zonnemulatoren wordt als de optimale lichtbron beschouwd. In zonnemulatoren worden xenonbooglampen en (gedoteerde) kwik-metaalhalidebooglampen gebruikt. Laatstgenoemde hebben het voordeel dat zij minder warmte afgeven en goedkoper zijn, maar de overeenstemming met het zonlicht is niet volmaakt. Aangezien alle zonnemulatoren significante hoeveelheden UVB uitstralen, moeten er filters worden toegepast om de hoogcytotoxische UVB-golflengtes te verzwakken.

Voor de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest moet een bestralingspectrum worden gebruikt dat vrijwel geen UVB bevat (UVA:UVB ~ 1:20). Er is een voorbeeld gepubliceerd van de spectrale stralingsverdeling van de gefilterde zonnemulator die is gebruikt in de valideringsstudie van de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest (3).

*Dosimetrie:* de intensiteit van het licht (bestralingssterkte) moet regelmatig voor elke fototoxiciteitstest worden gecontroleerd met een geschikte breedband-UV-meter. De UV-meter moet op de bron zijn gekalibreerd. De werking van de UV-meter moet worden gecontroleerd en daarvoor wordt het gebruik van een tweede referentie-UV-meter van hetzelfde type en met dezelfde kalibratie aanbevolen. Idealiter moet met grotere intervallen een spectroradiometer worden gebruikt om de spectrale stralingssterkte van de gefilterde lichtbron te meten en de kalibratie van de breedband-UV-meter te controleren, maar dergelijke instrumenten vereisen speciaal opgeleid personeel.

In de valideringsstudie is vastgesteld dat een dosis van 5 J/cm<sup>2</sup> (UVA) niet-cytotoxisch is voor Balb/c 3T3 cellen maar toch voldoende sterk om zelfs zwak fototoxische stoffen te exciteren. Om in 50 minuten een bestralingsdosis van 5 J/cm<sup>2</sup> te bereiken, moet de bestralingssterkte worden afgesteld op 1,666 mW/cm<sup>2</sup>. Als een andere cellijn of een andere lichtbron wordt gebruikt, kan het nodig zijn de UVA-dosis enigszins aan te passen rekening houdend met het criterium dat de straling de cellen geen schade mag berokkenen en krachtig genoeg moet zijn om standaardfototoxines te detecteren. De duur van de blootstelling aan het licht wordt als volgt berekend:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{bestralingsdosis (J/cm}^2\text{)} \times 1000}{\text{bestralingssterkte (mW/cm}^2\text{)} \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ W sec})$$

### 1.7.2. Testomstandigheden

De maximale concentratie van een te onderzoeken stof mag niet hoger zijn dan 100 µg/ml, aangezien alle fototoxische stoffen zijn gedetecteerd bij lagere concentraties, terwijl bij hogere concentraties de incidentie van fout-positieve resultaten toeneemt (13). De pH van de hoogste concentratie van de te onderzoeken stof moet een aanvaardbare waarde hebben (pH tussen 6,5 en 7,8).

Het bereik waarbinnen de concentraties van een met (+UVA) en zonder (-UVA) licht onderzochte stof moeten liggen, moet in voorbereidende experimenten worden bepaald. Het bereik en de intervallen van een concentratiereeks moeten zo worden gekozen dat de experimentele gegevens de concentratieresponskrommen voldoende onderbouwen. Er moeten geometrische concentratiereksen (met een constante verdunningsfactor) worden gebruikt.

### 1.7.3. Testprocedure<sup>(1)</sup>

#### 1.7.3.1. 1. Eerste dag

Bereid een celsuspensie van  $1 \times 10^5$  cellen/ml in een cultuurmedium en breng uitsluitend in de buitenste wells van een 96-wells microtiterplaat voor weefselkweek 100  $\mu$ l cultuurmedium aan (= blanco's). Breng in de overige wells 100  $\mu$ l celsuspensie van  $1 \times 10^5$  cellen/ml (=  $1 \times 10^4$  cellen/well) aan. Prepareer voor elke te onderzoeken stof twee platen: één voor de bepaling van de cytotoxiciteit (-UVA), en de ander voor de bepaling van de fotocytotoxiciteit (+UVA).

Incubeer de cellen gedurende 24 uur (7,5% CO<sub>2</sub>, 37°C) totdat zij een halfconfluente monocellulaire laag vormen. Deze incubatieperiode is lang genoeg voor het herstel en de hechting van de cellen en voor exponentiële groei.

#### 1.7.3.2. Tweede dag

Na incubatie het cultuurmedium van de cellen decanteren en tweemaal spoelen met 150  $\mu$ l EBSS/PBS per well. Voeg 100  $\mu$ l EBSS/PBS met de gewenste concentratie te onderzoeken stof dan wel enkel oplosmiddel (negatieve controle) toe. Breng 8 verschillende concentraties van de te onderzoeken stof aan. Incubeer de cellen met de te onderzoeken stof in het donker gedurende 60 minuten (7,5% CO<sub>2</sub>, 37°C).

Voor het (+UVA) deel van de test de cellen gedurende 50 minuten bij kamertemperatuur door het deksel van de 96-wells-plaat bestralen met 1,7 mW/cm<sup>2</sup> UVA (= 5 J/cm<sup>2</sup>). Ventileer met een ventilator om condensatie van H<sub>2</sub>O onder het deksel te voorkomen. Bewaar de duplicaatplaten (-UVA) bij kamertemperatuur gedurende 50 minuten (= UVA-blootstellingstijd) in een donkere kast.

Decanteer de testoplossing en spoel tweemaal met 150  $\mu$ l EBSS/PBS. Vervang EBSS/PBS door cultuurmedium en incubeer tot de volgende dag (18-22 h) (7,5% CO<sub>2</sub>, 37°C).

#### 1.7.3.3. Derde dag

Microscopisch onderzoek

Onderzoek de cellen onder een fasecontrastmicroscop. Leg de morfologische veranderingen van de cellen als gevolg van de cytotoxische effecten van de onderzochte stof vast. Deze controle wordt aanbevolen om experimentele fouten uit te sluiten, maar deze gegevens worden niet gebruikt voor de beoordeling van de cytotoxiciteit of fototoxiciteit.

Opname van neutraalrood

Spoel de cellen met 150  $\mu$ l voorverwarmede EBSS/PBS. Verwijder de spoeloplossing door voorzichtig af te tappen. Voeg 100  $\mu$ l NR medium toe en incubeer gedurende 3 uur op 37°C, in een gehumidificeerde atmosfeer met 7,5% CO<sub>2</sub>.

Na incubatie het NR-medium verwijderen en de cellen spoelen met 150  $\mu$ l EBSS/PBS. Decanteren en EBSS/PBS volledig met vloeipapier verwijderen. (Andere mogelijkheid: omgekeerde plaat centrifugeran).

Voeg precies 150  $\mu$ l NR-desorptieoplossing (vers bereid ethanol/azijnzuur) toe.

Schud de microtiterplaat gedurende 10 minuten snel op een microtiterplaatschudder totdat het NR uit de cellen is geëxtraheerd en zich een homogene oplossing heeft gevormd.

Meet de optische dichtheid van het NR-extract bij 540 nm in een spectrofotometer, waarbij de blanco's als referentie worden gebruikt. Sla de gegevens in een geschikt bestandsformaat (bv. ASCII) op voor verdere analyse.

<sup>(1)</sup> Nadere gegevens zijn te vinden in referentie 12.



## 2. GEGEVENS

### 2.1. Kwaliteit van de gegevens en aantal gegevens

De gegevens moeten een zinvolle analyse van de met en zonder UVA/zichtbaar licht verkregen concentratie-responskrommen mogelijk maken. Als cytotoxiciteit wordt geconstateerd, moeten het concentratiebereik en de intervallen tussen de verschillende concentraties zo worden gekozen dat er een kromme aan de experimentele gegevens kan worden gefit. Aangezien het mogelijk is dat een onderzochte stof niet cytotoxisch is beneden de voorgeschreven maximumconcentratie van 100 µg/ml in het niet-belichte experiment (-UVA), maar zeer cytotoxisch bij bestraling (+UVA), kan het nodig zijn dat de concentratiebereiken die in beide onderdelen van het experiment moeten worden onderzocht, grootteordes verschillen om de vereiste kwaliteit van de gegevens te bereiken. Als in geen van beide onderdelen van het experiment (-UVA en +UVA), cytotoxiciteit wordt aangetroffen, volstaat een test met grote intervallen tussen de openvolgende doses tot aan de maximale concentratie.

Een duidelijk positief resultaat hoeft niet in een herhalingsexperiment te worden geverifieerd. Evenmin hoeven duidelijk negatieve resultaten te worden geverifieerd, op voorwaarde dat de onderzochte stof bij voldoende hoge concentraties was getest. In dergelijke gevallen volstaat één groot experiment voorafgegaan door één of meer voorbereidende experimenten om het concentratiebereik vast te stellen.

Tests met onduidelijke resultaten in de nabijheid van de grenswaarde van het voorspellingsmodel moeten ter verificatie worden herhaald.

Als herhaald testen nodig wordt geacht, kan het van belang zijn dat de experimentele omstandigheden worden gevarieerd om een duidelijk resultaat te bereiken. Een belangrijke variabele in deze test is het bereiden van oplossingen van de onderzochte stof. Bij de herhaling van een test kan het dan ook essentieel zijn dat deze omstandigheden (co-solvent, verpulvering, sonificeren) worden gevarieerd. Een andere mogelijkheid is de incubatietijd voor de bestraling te variëren. Een kortere tijd kan zinvol zijn voor stoffen die onstabiel zijn in water.

### 2.2. Verwerking van de resultaten

Waar mogelijk wordt bepaald bij welke concentratie van een onderzochte stof 50% inhibitie van de cellulaire NRU ( $EC_{50}$ ) optreedt. Dit kan worden gedaan door een geschikte niet-lineaire regressiemethode (bij voorkeur een Hillfunctie of logistische regressie) toe te passen op de concentratieresponsgegevens of door andere fit-technieken toe te passen (14). Voordat een  $EC_{50}$ -waarde voor verdere berekeningen wordt gebruikt, moet de kwaliteit van de fit worden gecontroleerd. Een andere mogelijkheid is de  $EC_{50}$ -waarde te bepalen met grafische fittestechnieken. In dit geval wordt aanbevolen waarschijnlijkheidspapier (x-schaal: logaritmisch, y-schaal: probit) te gebruiken, aangezien de concentratie-responsfunctie na deze transformatie in veel gevallen nagenoeg lineair zal zijn.

### 2.3. Beoordeling van de resultaten (voorspellende modellen)

#### 2.3.1. Voorspellend model versie 1: foto-irritatiefactor (PIF)

Als zowel met (+UVA) als zonder (-UVA) licht volledige concentratieresponskrommen zijn verkregen, wordt een foto-irritatiefactor van (PIF) berekend met de volgende formule:

$$(a) \quad PIF = \frac{EC_{50}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

$PIF < 5$ , wijst erop dat er geen fototoxisch potentieel is.  $PIF \geq 5$  wijst erop dat er fototoxisch potentieel is.

Als een stof alleen +UVA cytotoxisch is en -UVA getest geen cytotoxiciteit vertoont, kan de PIF niet worden berekend, hoewel het resultaat wijst op fototoxisch potentieel. In dergelijke gevallen kan een „> PIF” waarde worden berekend als de (-UV) cytotoxiciteitstest wordt uitgevoerd tot de hoogste testconcentratie ( $C_{max}$ ) en deze waarde wordt gebruikt om de „> PIF” waarde te berekenen.

$$(b) \quad > PIF = \frac{C_{max}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Als alleen een „> PIF” waarde kan worden verkregen, wijst elke waarde  $> 1$  erop dat er fototoxisch potentieel is.

Als er geen  $EC_{50}(-UV)$  en  $EC_{50}(+UV)$  kunnen worden berekend omdat de stof zelfs bij de hoogste testconcentratie geen cytotoxiciteit vertoont, wijst dit erop dat er geen fototoxisch potentieel is. In dergelijke gevallen wordt een formele waarde „PIF = \*1” gebruikt om het resultaat weer te geven:

$$(c) \quad PIF = *1 = \frac{C_{max}(-UV)}{C_{max}(+UV)}$$

Als alleen een „PIF = \*1” kan worden verkregen, wijst dit erop dat er geen fototoxisch potentieel is.

In de gevallen (b) en (c) moet bij de voorspelling van het fototoxisch potentieel zorgvuldig rekening worden gehouden met de bij de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest bereikte concentraties.

#### 2.3.2. Voorspellend model versie 2: gemiddeld foto-effect (MPE)

Een andere mogelijkheid is om een nieuwe versie van het model voor de voorspelling van het fototoxische potentieel toe te passen, die is ontwikkeld door gebruik te maken van gegevens van de EU/Colipa-valideringsstudie (15) en die in een latere studie van de *in vitro* fototoxiciteit van chemicaliën voor UV-filters blind is getest (13). Dit model heeft geen last van de beperking van het PIF-model in gevallen waarin geen EC<sub>50</sub> waarde kan worden verkregen. In dit model wordt het „gemiddelde-foto-effect” (MPE) gebruikt, een maat die is gebaseerd op de vergelijking van de volledige concentratieresponskrommen. Voor de toepassing van het MPE-model is speciale computersoftware ontwikkeld aan de Humboldt Universiteit (Berlijn), die kosteloos kan worden verkregen.

#### 2.4. Interpretatie van de resultaten

Een positief resultaat van de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest (PIF  $\geq$  5 of MPE  $\geq$  0,1) wijst erop dat de onderzochte stof fototoxisch potentieel heeft. Als dit resultaat wordt verkregen bij concentraties lager dan 100 µg/ml, is het waarschijnlijk dat de onderzochte stof ook onder verschillende blootstellingsomstandigheden *in vivo* fototoxisch is. Als alleen een positief resultaat wordt verkregen bij de hoogste testconcentratie van 100 µg/ml, kan het nodig zijn verder onderzoek te doen om het gevaar of de fototoxische potentie te bepalen. Dit kan betekenen dat gegevens nodig zijn over penetratie, absorptie en eventuele accumulatie van de stof in de huid, of dat ter bevestiging een andere test op de stof moet worden uitgevoerd, bijvoorbeeld met een humaan *in vitro* huidmodel.

Een negatief resultaat van de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest (PIF < 5 of MPE < 0,1) wijst erop dat de onderzochte stof onder de toegepaste omstandigheden niet fototoxisch was voor de zoogdiercellen in de cultuur. In gevallen waarin de stof kon worden getest tot de hoogste concentratie van 100 µg/ml, wijst een negatief resultaat erop dat de stof geen fototoxisch potentieel heeft en dat *in vivo* fototoxiciteit onwaarschijnlijk mag worden geacht. In gevallen waarin bij lagere concentraties identieke concentratietoxiciteitsresponsen (EC<sub>50</sub> +UV en EC<sub>50</sub> -UV) werden verkregen, kunnen de gegevens op dezelfde wijze worden geïnterpreteerd. Als echter geen toxiciteit is aangetoond (+UV en -UV) en de concentraties als gevolg van de beperkte oplosbaarheid in water beperkt waren tot waarden lager dan 100 µg/ml, valt te betwijfelen of de test geschikt is voor de betreffende stof en moet worden overwogen ter bevestiging een andere test uit te voeren (bv. met een *in vitro* huidmodel of een *ex vivo* huidmodel of een *in vivo* test).

### 3. RAPPORTAGE

#### Testrapport

Het testrapport moet de volgende informatie bevatten:

Onderzochte stof:

- identificatiegegevens en CAS-nummer, indien bekend,
- fysische toestand en zuiverheid,
- fysisch-chemische eigenschappen die voor de test van belang zijn,
- stabiliteit en fotostabiliteit, indien bekend.

Oplosmiddel:

- motivering van de keuze van het oplosmiddel,
- oplosbaarheid van de onderzochte stof in dit oplosmiddel,
- percentage oplosmiddel aanwezig in het behandelingsmedium (EBSS of PBS).

Cellen:

- type en bron van de cellen,
- afwezigheid van mycoplasma's,
- aantal celpassages indien bekend,
- UVA-gevoeligheid van de cellen, bepaald met de bestralingsapparatuur die in de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest wordt gebruikt.

Testomstandigheden (a) — incubatie vóór en na behandeling:

- type en samenstelling van het cultuurmedium,
- incubatieomstandigheden (CO<sub>2</sub>-concentratie, temperatuur, vochtigheid),
- incubatieduur (voorbehandeling, nabehandeling).

*Testomstandigheden (b) — behandeling met de stof:*

- motivering van de keuze van de concentraties van de onderzochte stof die met en zonder bestraling met UV/zichtbaar licht zijn gebruikt,
- in geval van beperkte oplosbaarheid van de onderzochte stof en afwezigheid van cytotoxiciteit: motivering van de hoogste geteste concentratie,
- samenstelling van het behandelingsmedium (gebufferde zoutoplossing),
- duur van de chemische behandeling.

*Testomstandigheden (c) — bestraling:*

- motivering van de keuze van de lichtbron,
- spectrale bestralingskarakteristieken van de lichtbron,
- transmissie/absorptiekarakteristieken van de filters,
- karakteristieken van de radiometer en gegevens over de kalibratie ervan,
- afstand van de lichtbron tot het testsysteem,
- UVA-bestralingsterkte op deze afstand uitgedrukt in  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ,
- duur van de blootstelling aan UV/zichtbaar licht,
- UVA-dosis (bestralingsterkte  $\times$  tijd), uitgedrukt in  $\text{J}/\text{cm}^2$ ,
- temperatuur waarbij de celculturen tijdens bestraling respectievelijk in het donker werden bewaard.

*Testomstandigheden (d) — NRU test:*

- samenstelling van NR-medium,
- duur van NR-incubatie,
- incubatieomstandigheden ( $\text{CO}_2$ -concentratie, temperatuur, vochtigheid),
- NR-extractieomstandigheden (extractiemiddel, duur),
- golflengte voor spectrofotometrische bepaling van NR optische dichtheid,
- tweede golflengte (referentie) indien gebruikt,
- inhoud van de blancocuvetten van de spectrofotometer indien van toepassing.

*Resultaten:*

- levensvatbaarheid van cellen bepaald bij elke concentratie van de onderzochte stof, uitgedrukt in gemiddelde procentuele levensvatbaarheid ten opzichte van de controles,
- concentratieresponskrommen (concentratie onderzochte stof vs. relatieve levensvatbaarheid van cellen) verkregen in parallelle +UVA en -UVA-experimenten,
- gegevensanalyse van de concentratieresponskrommen: zo mogelijk berekening van  $\text{EC}_{50}$  (+UVA) en  $\text{EC}_{50}$  (-UVA),
- vergelijking van de twee concentratieresponskrommen die zijn verkregen met respectievelijk zonder bestraling met UVA/zichtbaar licht, hetzij door berekening van de foto-irritatiefactor (PIF), hetzij door berekening van het gemiddelde foto-effect (MPE),
- classificatie van het fototoxische potentieel,
- criteria voor acceptatie van de test (a) — parallelle negatieve controle:
  - absolute levensvatbaarheid (optische dichtheid van NR-extract) bestraalde en niet-bestraalde cellen,
  - bestaande gegevens m.b.t. negatieve controle: gemiddelde en standaarddeviatie,
- criteria voor acceptatie van de test (b) — parallelle positieve controle:
  - $\text{EC}_{50}$ (+UVA) en  $\text{EC}_{50}$ (-UVA) en PIF van voor positieve controle gebruikte stof,
  - bestaande gegevens m.b.t. voor positieve controle gebruikte stof:  $\text{EC}_{50}$ (+UVA) and  $\text{EC}_{50}$ (-UVA) en PIF: gemiddelde en standaarddeviatie.

*Bespreking van de resultaten.*

*Conclusies.*

- (1) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Epalttenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W., Pfannenbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994), EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay, *Toxicology in Vitro* 8, blz. 793-796.
- (2) Anon (1998), Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA 26, blz. 7-8.
- (3) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clotier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W. and Brantom, P. (1998), EU/COLIPA „*In vitro* phototoxicity” validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology in Vitro* 12, blz. 305-327.
- (4) OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods, OECD Publications Office, Paris, 1996.
- (5) Lovell, W.W. (1993), A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential, *Toxicology in Vitro* 7, blz. 95-102.
- (6) Santamaria, L. and Prino, G. (1972), List of the photodynamic substances, *Research progress in organic, biological and medicinal chemistry* Vol. 3 Part 1, North Holland Publishing Co, Amsterdam, blz. XI-XXXV.
- (7) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O. and Sladowski, D. (1994), *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2, ATLA 22, blz. 314-348.
- (8) Spikes, J.D. (1989), Photosensitization, *The science of photobiology*, edited by KC Smith, Plenum Press, New York, 2nd edition, blz. 79-110.
- (9) Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985), Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters* 24, blz. 119-124.
- (10) Lambert L. A, Warner W.G. and Kornhauser A. (1996), Animal models for phototoxicity testing, *Dermatotoxicology*, edited by FN Marzulli and HI Maibach, published by Taylor & Francis, Washington DC, 5th Edition, blz. 515-530.
- (11) Tyrrell R.M. and Pidoux M (1987), Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes, *Cancer Research* 47, blz. 1825-1829.
- (12) ZEBET/ECVAM/COLIPA, Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test, drafted 23 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management Team of the EU/COLIPA project „*In Vitro* Photoirritation”.
- (13) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. and Pfannenbecker (1998), A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU *In Vitro* Phototoxicity Test, ATLA 26, blz. 679-708.
- (14) Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, *Journal of Biological Systems* 3, blz. 127-138.
- (15) Holzhütter, H.G. (1997), A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals, ATLA 25, blz. 445-462.

Plaats van de 3T3 NRU fototoxiciteitstests in een stapsgewijze bepaling van de fototoxiciteit van stoffen

