Raad van de
Europese Unie

Brussel, 25 februari 2019
(OR. en)

6800/19
ADD 1

COMPET 206
ENV 212
CHIMIE 36
MI 195
ENT 53
SAN 104
CONSOM 77
EMPL 121
SOC 153

BEGELEIDENDE NOTA

van:	de Europese Commissie
ingekomen:	22 februari 2019
aan:	het secretariaat-generaal van de Raad
Betreft:	Bijlage bij VERORDENING (EU) …/... VAN DE COMMISSIE van XXX tot wijziging, in verband met de aanpassing ervan aan de technische vooruitgang, van de bijlage bij Verordening (EG) nr. 440/2008 houdende vaststelling van testmethoden uit hoofde van Verordening (EG) nr. 1907/2006 van het Europees Parlement en de Raad inzake de registratie en beoordeling van en de autorisatie en beperkingen ten aanzien van chemische stoffen (REACH)

Hierbij gaat voor de delegaties document D060575/02 - Bijlage.

Bijlage: D060575/02 - Bijlage

Bijlage – (Deel 1/2)

NL

BIJLAGE

De bijlage bij Verordening (EG) nr. 440/2008 wordt als volgt gewijzigd:

1) In deel B wordt hoofdstuk B.4 vervangen door:

"B.4. ACUTE TOXICITEIT: HUIDIRRITATIE/CORROSIE

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 404 (2015) van de OESO. De richtlijnen van de OESO voor het testen van chemische stoffen worden periodiek herzien om te waarborgen dat ze de beste wetenschappelijke methoden weerspiegelen. Bij de herziening van OESO TG 404 is bijzondere aandacht besteed aan mogelijke verbeteringen met het oog op het welzijn van de dieren en aan de evaluatie van alle bestaande informatie over de teststof om onnodige tests bij proefdieren te vermijden. In de bijgewerkte versie van OESO TG 404 (oorspronkelijk vastgesteld in 1981, herzien in 1992, 2002, 2015), die verwijst naar de OESO-leidraad voor een geïntegreerde test- en beoordelingsbenadering (Integrated Approach on Testing and Assessment, IATA) voor huidcorrosie en -irritatie (1), wordt een modulaire benadering voor het testen op huidirritatie en huidcorrosie voorgesteld. De IATA omvat verschillende modules met gedeelde informatiebronnen en analyse-instrumenten en i) biedt richtsnoeren voor de integratie en het gebruik van bestaande gegevens die zijn verzameld met behulp van test- en niet-testmethoden om het potentieel voor huidirritatie en -corrosie van chemische stoffen te beoordelen en ii) draagt een benadering aan voor wanneer verder testen nodig is (1). Bovendien wordt in die richtlijn aanbevolen om bij de voorlopige in-vivotest de drie testgaasjes waar nodig niet tegelijkertijd maar achtereenvolgens bij het dier aan te brengen.

2. De definities van huidirritatie en huidcorrosie zijn opgenomen in het aanhangsel bij deze testmethode.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

3. In het belang van zowel wetenschappelijke kwaliteit als het dierenwelzijn moeten er geen in-vivotests worden uitgevoerd voordat alle beschikbare gegevens over de mogelijke huidcorrosiviteit/-irritatie door de teststof zijn geëvalueerd in een bewijskrachtanalyse zoals beschreven in de OESO-leidraad voor een geïntegreerde test- en beoordelingsbenadering voor huidcorrosie en -irritatie, d.w.z. in de drie delen van deze

leidraad en de bijbehorende modules (1). In Deel 1 worden bestaande gegevens behandeld in zeven modules over gegevens verzameld bij mensen, in-vivogegevens, in-vitrogegevens, gegevens over fysisch-chemische eigenschappen (bv. pH, vooral sterke zuurgraad of alkaliniteit) en niet-testmethoden. In Deel 2 wordt een bewijskrachtanalyse uitgevoerd. Als deze bewijskrachtanalyse geen uitsluitsel geeft, moet Deel 3 worden uitgevoerd met aanvullende tests, te beginnen met in-vitromethoden en wordt pas in laatste instantie overgegaan tot het gebruik van in-vivotests. Door een dergelijke analyse zijn er dan ook minder in-vivotests nodig op huidcorrosiviteit/-irritatie door teststoffen waarvoor al voldoende bewijsmateriaal bestaat uit andere onderzoeken met deze twee eindpunten.

PRINCIPE VAN DE IN-VIVOTEST

4. De teststof wordt in één dosis op de huid van een proefdier aangebracht; de onbehandelde huid van het proefdier wordt als controle gebruikt. De mate van irritatie/corrosie wordt op bepaalde tijdstippen afgelezen en ingeschaald en wordt nader beschreven om een volledige evaluatie van de effecten mogelijk te maken. De duur van het onderzoek moet voldoende zijn om te kunnen beoordelen of de waargenomen effecten reversibel of irreversibel van aard zijn.

5. Dieren die gedurende een fase van de test voortdurend tekenen van ernstig ongerief en/of hevige pijn vertonen, moeten op humane wijze worden gedood en de teststof moet dienovereenkomstig worden beoordeeld. Criteria voor de beslissing om stervende en hevig lijdende dieren op humane wijze te doden zijn te vinden in een afzonderlijke leidraad (2).

VOORBEREIDING VAN DE IN-VIVOTEST

Keuze van de diersoort

6. Als proefdier wordt de voorkeur gegeven aan het albinokonijn en er worden gezonde jonge volwassen konijnen gebruikt. Wanneer er een andere soort wordt gebruikt, moet hiervoor een motivering worden gegeven.

Voorbereiding van de dieren

7. Ongeveer 24 uur voor de test wordt het haar op het ruggedeelte van de romp van de dieren door kort afknippen verwijderd. Er moet op worden gelet dat de huid niet wordt geschaafd. Alleen dieren met een gezonde en gave huid mogen worden gebruikt.

8. Sommige konijnenstammen hebben plekken met dichte haargroei, die in bepaalde perioden van het jaar meer op de voorgrond treden. De test mag niet op deze plekken met dichte haargroei worden uitgevoerd.

Huisvesting en voeding

9. De dieren worden in aparte kooien gehuisvest. De temperatuur in de proefdierruimte moet 20 °C (± 3 °C) zijn. Hoewel de relatieve luchtvochtigheid ten minste 30 % moet bedragen en, behalve tijdens het schoonmaken van de ruimte, bij voorkeur niet hoger mag zijn dan 70 %, moet worden gestreefd naar 50-60 %. Verlichting gebeurt met kunstlicht met een ritme van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater.

TESTPROCEDURE

Het aanbrengen van de teststof

10. De teststof wordt aangebracht op een klein huidoppervlak (ongeveer 6 cm^2) en de plek wordt bedekt met een gaasje dat met behulp van niet-irriterend plakband op zijn plaats wordt gehouden. Wanneer de stof niet direct kan worden aangebracht (bijvoorbeeld bij vloeistoffen of bepaalde pasta's), wordt de teststof eerst op het gaasje aangebracht en wordt dit daarna op de huid bevestigd. Het gaasje moet gedurende de blootstellingsperiode door middel van een geschikt semi-occlusief verband in licht contact met de huid blijven. Als de teststof op het gaasje wordt aangebracht, moet dit zodanig op de huid worden bevestigd dat er een goed contact en een uniforme verdeling van de teststof op de huid is. Er moet tevens voor worden gezorgd dat het gaasje voor het dier onbereikbaar is en dat inslikken of inademen van de teststof onmogelijk is.

11. Vloeibare teststoffen worden in het algemeen onverdund gebruikt. Bij een proef met vaste stoffen (die indien nodig eventueel kunnen worden verpoederd) moet de teststof met een zo klein mogelijke hoeveelheid water (of indien nodig een ander geschikt vehiculum) worden bevochtigd om voor een goed contact met de huid te zorgen. Wanneer een ander vehiculum dan water wordt gebruikt, moet een eventuele invloed van het vehiculum op de irritatie van de huid door de teststof minimaal zijn.

12. Aan het einde van de blootstellingsperiode, die normaal gesproken 4 uur bedraagt, moeten de resten van de teststof zo mogelijk met water of met een geschikt oplosmiddel worden verwijderd zonder de bestaande respons of de intacte epidermis te wijzigen.

Dosisniveau

13. Een dosis van 0,5 ml vloeistof of 0,5 g vaste stof of pasta wordt op het testgedeelte van de huid aangebracht.

Voorlopige test (in-vivotest op huidirritatie/corrosie met één dier)

14. Wanneer een teststof op basis van een bewijskrachtanalyse of eerdere in-vitrotests als corrosief, irriterend of niet-ingedeeld wordt beschouwd, zijn verdere in-vivotests normaal gesproken niet nodig. Wanneer aanvullende gegevens nodig worden geacht, wordt de in-vivotest in eerste instantie met één dier uitgevoerd, waarbij de volgende benadering wordt

toegepast. Bij het dier worden achtereenvolgens maximaal drie testgaasjes aangebracht. Het eerste gaasje wordt na drie minuten verwijderd. Als er geen ernstige huidreactie wordt waargenomen, wordt op een andere plek een tweede gaasje aangebracht dat na een uur wordt verwijderd. Als de waarnemingen in deze fase erop wijzen dat het niet onmenselijk is de blootstelling tot vier uur te verlengen, wordt een derde gaasje aangebracht, dat na vier uur wordt verwijderd, en wordt de reactie ingeschaald.

15. Als er na een van de drie achtereenvolgende blootstellingen een corrosiereactie wordt waargenomen, wordt de test onmiddellijk gestaakt. Als er na de verwijdering van het laatste gaasje geen corrosiereactie wordt waargenomen, wordt het dier gedurende 14 dagen geobserveerd tenzij er vóór die tijd al corrosie ontstaat.

16. Wanneer er niet wordt verwacht dat de teststof corrosie veroorzaakt maar deze wel irriterend kan zijn, wordt er één gaasje gedurende vier uur op één dier aangebracht.

Bevestigende test (in-vivotest op huidirritatie/corrosie met meer dieren)

17. Als er bij de voorlopige test geen corrosiereactie wordt waargenomen, moet de irritatie of negatieve reactie worden bevestigd met nog eens twee dieren die elk gedurende vier uur aan één gaasje worden blootgesteld. Als er bij de voorlopige test irritatie wordt waargenomen, kan de bevestigende test op sequentiële wijze worden uitgevoerd of door nog eens twee dieren tegelijkertijd bloot te stellen. Wanneer in een uitzonderlijk geval de voorlopige test niet wordt uitgevoerd, kunnen twee of drie dieren met één gaasje worden behandeld dat na vier uur wordt verwijderd. Wanneer er twee dieren worden gebruikt die beide dezelfde reactie vertonen, is verder testen niet nodig. Als de reactie verschilt, wordt ook het derde dier getest. Er kunnen extra dieren nodig zijn om duidelijkheid te krijgen omtrent moeilijk te interpreteren reacties.

Observatieperiode

18. De duur van de observatieperiode moet voldoende zijn om volledig te kunnen beoordelen of de waargenomen effecten reversibel zijn. Het experiment moet echter worden beëindigd zodra het dier voortdurend tekenen van hevige pijn of ernstig ongerief vertoont. Om te bepalen of de effecten reversibel zijn, moeten de dieren maximaal 14 dagen na de verwijdering van de gaasjes worden geobserveerd. Als al vóór het verstrijken van de 14 dagen wordt geconstateerd dat de effecten reversibel zijn, wordt het experiment op dat moment beëindigd.

Klinische observatie en inschaling van de huidreacties

19. Alle dieren worden op tekenen van erytheem en oedeem onderzocht en de respons wordt 60 minuten en vervolgens 24, 48 en 72 uur na de verwijdering van het gaasje ingeschaald. Bij de voorlopige test bij één dier wordt de huid ook onmiddellijk na de verwijdering van het gaasje onderzocht. De huidreactie wordt in een van de categorieën in de tabel

ingeschaald en geregistreerd. Als er sprake is van een beschadiging van de huid die na 72 uur niet als irritatie of corrosie kan worden geïdentificeerd, kan het nodig zijn de observatie tot dag 14 voort te zetten om te bepalen of de effecten reversibel zijn. Naast de observatie van irritatie worden ook alle lokale toxische effecten, zoals ontvetting van de huid, en alle systemische schadelijke effecten (zoals effecten op klinische toxiciteitsverschijnselen en het lichaamsgewicht) volledig beschreven en geregistreerd. Om duidelijkheid te krijgen omtrent moeilijk te interpreteren reacties moet histopathologisch onderzoek worden overwogen.

20. De inschaling van huidreacties is per definitie subjectief. Om harmonisatie bij de inschaling van huidreacties te bevorderen en ter ondersteuning van de testlaboratoria en de personen die bij het uitvoeren en het interpreteren van de observatie betrokken zijn, moet het personeel dat de observatie uitvoert afdoende zijn opgeleid in het gebruikte scoresysteem (zie de tabel). Een geïllustreerde leidraad voor de inschaling van huidirritatie en ander letsel kan nuttig zijn (3). De inschaling van de huidreacties moet blind gebeuren.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

21. De resultaten van het onderzoek worden in het eindverslag in tabelvorm vermeld en hierin worden alle onder punt 24 vermelde gegevens opgenomen.

Evaluatie van de resultaten

22. De scores voor de huidirritatie worden in samenhang met de aard en ernst van het letsel en de vraag of dit al dan niet reversibel is, beoordeeld. De individuele scores vormen geen absolute norm voor de irriterende eigenschappen van een materiaal, aangezien ook andere effecten van het testmateriaal worden beoordeeld. De individuele scores moeten veeleer als referentiewaarden worden beschouwd, die in combinatie met alle andere waarnemingen tijdens het onderzoek moeten worden geëvalueerd.

23. Bij de beoordeling van de irritatiereactie moet rekening worden gehouden met de reversibiliteit van het huidletsel. Wanneer reacties als haaruitval (beperkt gebied), hyperkeratose, hyperplasie en schilfering tot het einde van de observatieperiode van 14 dagen blijven bestaan, moet de teststof als irriterend worden beschouwd.

Testverslag

24. In het testverslag worden de volgende gegevens opgenomen:

Motivering voor in-vivo test:

- bewijskrachtanalyse van reeds bestaande testgegevens, zoals de resultaten van een sequentiële teststrategie:
- een beschrijving van de relevante gegevens die van eerdere tests beschikbaar zijn;

- de gegevens die bij elke fase van de teststrategie verkregen zijn;
- een beschrijving van de uitgevoerde in-vitrotests met een gedetailleerde beschrijving van de procedures en de resultaten die met test/referentiestoffen verkregen zijn;
- een bewijskrachtanalyse voor de uitvoering van het in-vivo-onderzoek.

Teststof:

- stof die uit één component bestaat: chemische identificatiegegevens, zoals IUPAC- of CAS-naam, CAS-nummer, SMILES- of InChI-code, structuurformule, zuiverheid, chemische identiteit van onzuiverheden, indien van toepassing en praktisch haalbaar enz.;
- stof die uit meerdere componenten bestaat, mengsel en stoffen waarvan de samenstelling niet bekend of variabel is, complexe reactieproducten of biologische materialen (UVCB): voor zover mogelijk, karakterisering aan de hand van chemische identiteit (zie hierboven), kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen van de bestanddelen;
- fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water en aanvullende relevante fysisch-chemische eigenschappen;
- bron, partijnummer indien beschikbaar;
- behandeling van de teststof/controlestof voorafgaand aan het testen, indien van toepassing (bv. opwarming, malen);
- stabiliteit van de teststof, uiterste gebruiksdatum, of datum voor heranalyse, indien bekend;
- bewaaromstandigheden.

Vehiculum:

- identificatiegegevens, de concentratie (indien van toepassing) en het gebruikte volume;
- een motivering voor de keuze van het vehiculum.

Proefdier(en):

- de gebruikte soort(en)/stam(men) en een motivering indien (een) ander(e) dier(en) dan het albinokonijn worden gebruikt;
- het aantal dieren van elk geslacht;
- het gewicht van elk dier aan het begin en het eind van de test;
- de leeftijd aan het begin van het onderzoek;
- de herkomst van het/de dier(en), de huisvesting, de voeding enz.

Testomstandigheden:

- de techniek voor de voorbereiding van de plaats waarop het gaasje wordt aangebracht;
- een gedetailleerde beschrijving van het gebruikte verbandmateriaal en de verbandtechniek;
- gedetailleerde gegevens over het bereiden, het aanbrengen en het verwijderen van de teststof.

Resultaten:

- een tabel met de score van de irritatie/corrosiereactie voor elk dier op elk observatietijdstip;
- beschrijvingen van alle waargenomen letsels;
- een beschrijving in woorden van de aard en de ernst van de waargenomen irritatie of corrosie met eventuele histopathologische bevindingen;
- een beschrijving van andere schadelijke lokale (bijvoorbeeld ontvetting van de huid) en systemische effecten naast de huidirritatie of corrosie.

Bespreking van de resultaten

Conclusies

LITERATUUR

(1) OESO (2014). Guidance document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(2) OESO (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, november 1998 .

(3) OESO (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 19), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

TABEL: INSCHALING VAN DE HUIDREACTIES

Vorming van erytheem en korsten

Geen erytheem.……0

Zeer licht erytheem (nauwelijks waarneembaar).……1

Duidelijk gedefinieerd erytheem.……2

Matig tot ernstig erytheem.……3

Ernstig erytheem (diep rood) tot korstvorming waardoor de inschaling van erytheem onmogelijk is…… 4

Maximale score: 4

Vorming van oedeem

Geen oedeem……0

Zeer licht oedeem (nauwelijks waarneembaar)……1

Licht oedeem (de randen van het gebied zijn goed zichtbaar door duidelijke zwelling)…….2

Matig oedeem (ongeveer 1 mm zwelling)……3

Ernstig oedeem (meer dan 1 mm zwelling tot buiten het blootstellingsgebied).……4

Maximale score: 4

Om duidelijkheid te krijgen omtrent moeilijk te interpreteren reacties kan histopathologisch onderzoek worden uitgevoerd.

Aanhangsel

DEFINITIES

Chemische stof: een stof of mengsel.

Huidirritatie: het ontstaan van een omkeerbare beschadiging van de huid na het aanbrengen van een teststof gedurende maximaal 4 uur.

Huidcorrosie: het ontstaan van een irreversibele beschadiging van de huid, namelijk zichtbare necrose door de epidermis heen in de dermis, na het aanbrengen van een teststof gedurende ten hoogste vier uur. Corrosieve reacties worden gekenmerkt door zweren, bloedingen, bloederige korsten en aan het eind van de observatie na 14 dagen door verkleuring ten gevolge van het verbleken van de huid, stukken huidoppervlak die kaal geworden zijn en littekens. Om twijfelachtig letsel te evalueren moet histopathologie worden overwogen.

Teststof: elke volgens deze testmethode getest(e) stof of mengsel.".

2) In deel B wordt hoofdstuk B.17 vervangen door:

"B.17. IN-VITROGENMUTATIETESTS MET ZOOGDIERCELLEN AAN DE HAND VAN DE GENEN VOOR HPRT EN XPRT

INLEIDING

1. Deze testmethode (TM) is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 476 (2016) van de OESO. Testmethoden worden periodiek herzien in het licht van de wetenschappelijke vooruitgang, veranderende regelgevingsbehoeften en dierenwelzijn. In deze herziene versie van TM B.17. is bijna dertig jaar ervaring met deze test verwerkt. Daarnaast is er een afzonderlijke nieuwe methode ontwikkeld voor in-vitrogenmutatietests met zoogdiercellen aan de hand van het gen voor thymidinekinase. TM B.17. maakt deel uit van een reeks testmethoden op het gebied van de genetische toxicologie. De OESO heeft een document opgesteld met beknopte informatie over genetisch-toxicologische tests en een overzicht van de recente wijzigingen van de OESO-testrichtlijnen voor genetische toxiciteit (1).

2. De in-vitrogenmutatietest met zoogdiercellen is bedoeld voor de detectie van genmutaties die door chemische stoffen zijn geïnduceerd. In de cellijnen die in deze tests worden gebruikt, worden voorwaartse mutaties gemeten in reportergenen, met name het endogene gen voor hypoxanthine-phosguanine-fosforibosyltransferase (Hprt in knaagdiercellen, HPRT in menselijke cellen; in deze testmethode samen aangeduid als het Hprt-gen en de HPRT-test) en het xanthine-guanine-fosforibosyltransferase-transgen (gpt) (aangeduid als de XPRT-test). Bij de HPRT- en XPRT-mutatietests worden verschillende spectra van genetische gebeurtenissen gedetecteerd. Afgezien van de mutationele gebeurtenissen die door de HPRT-test worden gedetecteerd (bv. basenpaarsubstituties, leesraammutaties en kleine deleties en inserties) kunnen door de ligging van het gpt-transgen op autosomen mutaties worden gedetecteerd die het gevolg zijn van grote deleties en mogelijk mitotische recombinatie en die niet kunnen worden gedetecteerd door de HPRT-test, omdat het Hprt-gen op het X-chromosoom ligt (2) (3) (4) (5) (6) (7). Voor regelgevingsdoeleinden wordt de XPRT-test op dit moment minder algemeen gebruikt dan de HPRT-test.

3. Gebruikte definities worden gegeven in aanhangsel 1.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

4. Bij in vitro uitgevoerde tests moet er meestal een exogene metabole activeringsbron worden gebruikt. Het exogene metabole activeringssysteem kan de omstandigheden in vivo niet volledig nabootsen.

5. Er moet goed op worden gelet dat omstandigheden die kunnen leiden tot artefactuele positieve resultaten (d.w.z. mogelijke interactie met het testsysteem), die niet het gevolg zijn van directe interactie tussen de teststoffen en het genetische materiaal van de cel,

worden vermeden; zulke omstandigheden zijn onder andere veranderingen in de pH of de osmolaliteit (8) (9) (10), interactie met de bestanddelen van het medium (11) (12) of een te sterke cytotoxiciteit (13). Als de cytotoxiciteit de maximaal aanbevolen cytotoxiciteitsniveaus zoals omschreven in punt 19 overschrijdt, wordt deze als te sterk beschouwd voor de HPRT-test.

6. Voordat de testmethode wordt gebruikt op een mengsel om gegevens te genereren voor een beoogd regelgevingsdoel, moet worden nagegaan of, en zo ja, waarom deze methode betrouwbare resultaten oplevert voor dat doel. Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is.

PRINCIPE VAN DE TEST

7. Mutantcellen met een deficiëntie aan Hprt-enzymactiviteit in de HPRT-test of xprt-enzymactiviteit in de XPRT-test zijn resistent voor de cytostatische effecten van de purineanaloog 6-thioguanine (TG). Cellen zonder deficiëntie aan Hprt (in de HPRT-test) of xprt (in de XPRT-test) zijn gevoelig voor TG, waardoor het celmetabolisme wordt geremd en er geen celdeling meer plaatsvindt. Dit betekent dat mutantcellen zich in aanwezigheid van TG kunnen voortplanten en normale cellen, die Hprt (in de HPRT-test) of xprt (in de XPRT-test) bevatten, niet.

8. Cellen in suspensie of monolaagculturen worden zowel met als zonder een exogene metabole activeringsbron (zie punt 14) gedurende een geschikte periode (3-6 uur) aan de teststof blootgesteld en vervolgens overgeënt om de cytotoxiciteit te bepalen en fenotypische expressie mogelijk te maken alvorens de mutanten te selecteren (14) (15) (16) (17). De cytotoxiciteit wordt bepaald aan de hand van de relatieve overleving (relative survival of RS), d.w.z. de onmiddellijk na behandeling gemeten kloneringsefficiëntie, gecorrigeerd voor eventueel verlies van cellen gedurende de behandeling, vergeleken met de negatieve controle (zie punt 18 en aanhangsel 2). De behandelde culturen blijven een voldoende lange periode, kenmerkend voor elk celtype, in groeimedium om een vrijwel optimale fenotypische expressie van de geïnduceerde mutaties mogelijk te maken (doorgaans ten minste 7-9 dagen). Na fenotypische expressie wordt de mutantfrequentie bepaald door bekende aantallen cellen te enten in medium met de selecterende stof voor de detectie van mutantkolonies 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, gecorrigeerd voor de kloneringsefficiëntie op het moment van selecteren van de mutanten.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Voorbereidingen

Cellen

9. Van de bij de HPRT-test en de XPRT-test gebruikte cellen moet worden aangetoond dat ze gevoelig zijn voor chemische mutagenen en een hoge kloneringsefficiëntie, een stabiel karyotype en een stabiele spontane mutantfrequentie hebben. De meest gebruikte cellen voor de HPRT-test zijn onder meer de cellijnen CHO, V79 en CHL van Chinese hamsters, L5178Y-muizenlymfoomcellen en humane TK6-lymfoblastoïdcellen (18) (19). Voor de XPRT-test worden CHO-AS52-cellen gebruikt die het gpt-transgen bevatten (en waarbij deletie van het Hprt-gen heeft plaatsgevonden) (20) (21); vanwege de deletie van het Hprt-gen kan de HPRT-test niet worden uitgevoerd bij AS52-cellen. Gebruik van andere cellijnen moet verantwoord en gevalideerd worden.

10. De cellijnen moeten geregeld worden gecontroleerd om na te gaan of het modale aantal chromosomen stabiel is en er geen besmetting met mycoplasma heeft plaatsgevonden (22) (23). Indien er wel een besmetting heeft plaatsgevonden of indien het modale aantal chromosomen gewijzigd is, mogen de cellen niet worden gebruikt. De normale tijd voor de in het testlaboratorium gebruikte celcyclus moet worden vastgesteld en moet overeenkomen met de gepubliceerde celkenmerken. Bovendien moet de spontane mutantfrequentie in de voorraad mastercellen worden gecontroleerd. Als de mutantfrequentie niet aanvaardbaar is moet de voorraad niet worden gebruikt.

11. Het is wellicht nodig reeds aanwezige mutantcellen uit de cultuur te verwijderen voordat deze voor de test wordt gebruikt, bv. door te kweken in HAT-medium voor de HPRT-test en MPA voor de XPRT-test (5) (24) (zie aanhangsel 1). De overgebleven cellen kunnen worden gecryopreserveerd en vervolgens ontdooid om als werkvoorraad te worden gebruikt. Net ontdooide werkvoorraad kan voor de test worden gebruikt zodra normale verdubbelingstijden worden bereikt. Bij de uitvoering van de XPRT-test moet de gangbare kweek van AS52-cellen plaatsvinden onder omstandigheden waarbij het behoud van het gpt-transgen gewaarborgd is (20).

Media en kweekomstandigheden

12. Er moet worden gezorgd voor geschikte kweekmedia en incubatieomstandigheden voor de culturen (kweekvaten, vochtige atmosfeer van 5 % CO_2 en incubatietemperatuur van 37 °C). De celculturen moeten altijd onder zodanige omstandigheden worden gehouden dat ze in log-fase groeien. Het is vooral belangrijk dat de medium- en kweekomstandigheden zodanig worden gekozen dat de celgroei tijdens de expressieperiode en de kloneringsefficiëntie van zowel de mutantcellen als de gewone cellen optimaal zijn.

Prepareren van de culturen

13. Cellijnen uit stamculturen worden met een zodanige dichtheid in een kweekmedium geënt dat de cellen in suspensies of in monolagen tijdens de behandelingsperiode en de

expressieperiode exponentieel zullen blijven groeien (voor cellen die in monolagen groeien, moet bijvoorbeeld samenvloeiing worden voorkomen).

Metabole activering

14. Exogene metabole activeringssystemen moeten worden gehanteerd bij het gebruik van cellen met ontoereikende endogene metabole capaciteit. Het meest gebruikte systeem, dat als standaard wordt aanbevolen, tenzij anders wordt gemotiveerd, is een post-mitochondriale fractie aangevuld met een cofactor (S9), verkregen uit de lever van knaagdieren (doorgaans ratten) die zijn behandeld met enzym-inducerende stoffen als Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) of een combinatie van fenobarbiton en β-naftoflavon (29) (30) (31) (32). De laatste combinatie druist niet in tegen het Verdrag van Stockholm inzake persistente organische verontreinigende stoffen (33). Bovendien is aangetoond dat zij even effectief is als Aroclor 1254 voor de inducering van oxidasen met gemengde functie (29) (31). De S9-fractie wordt meestal gebruikt bij een concentratie van 1 tot 2 % (v/v), maar mag worden verhoogd tot 10 % (v/v) in het uiteindelijke testmedium. De keuze van het type en de concentratie van het exogene metabole activeringssysteem dat of de metabole inductor die wordt gebruikt, kan worden beïnvloed door de klasse van de te testen stoffen (34) (35) (36).

Teststofbereiding

15. Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen worden bereid en eventueel vóór de behandeling van de cellen worden verdund (zie punt 16). Vloeibare teststoffen kunnen direct aan het testsysteem worden toegevoegd en/of worden verdund vóór de behandeling van het testsysteem. Bij het testen van gassen of vluchtige teststoffen moeten geschikte aanpassingen van de standaardprotocollen worden gevolgd, zoals de behandeling in gesloten kweekvaten (37) (38). Preparaten van de teststof moeten worden bereid vlak vóór de behandeling, tenzij met stabiliteitsgegevens is aangetoond dat bewaren van het preparaat aanvaardbaar is.

TESTOMSTANDIGHEDEN

Oplosmiddelen

16. Het oplosmiddel wordt zo gekozen dat het de oplosbaarheid van de te testen chemische stoffen vergroot zonder een negatieve invloed te hebben op het verloop van de test, bv. door veranderingen in de celgroei, aantasting van de integriteit van de teststof, reacties met kweekvaten, belemmering van het metabole activeringssysteem. Het wordt aanbevolen waar mogelijk eerst het gebruik van een waterig oplosmiddel (of kweekmedium) te overwegen. Gangbare oplosmiddelen zijn bijvoorbeeld water en dimethylsulfoxide. Organische oplosmiddelen mogen in de regel de 1 % (v/v) en waterige oplosmiddelen (fysiologisch zout of water) de 10 % (v/v) in het uiteindelijke behandelingsmedium niet overschrijden. Als de gebruikte oplosmiddelen geen gangbare oplosmiddelen zijn (bv.

ethanol of aceton), moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze verenigbaar zijn met de teststof en het testsysteem, en dat zij geen genetische toxiciteit vertonen bij de gebruikte concentratie. Als die gegevens ontbreken, is het belangrijk ook onbehandelde controles toe te voegen (zie aanhangsel 1) om aan te tonen dat het gekozen oplosmiddel geen schadelijke of mutagene effecten induceert.

Meting van cytotoxiciteit en keuze van blootstellingsconcentraties

17. Bij de bepaling van de hoogste te testen concentratie van de teststof moeten concentraties worden vermeden die kunnen leiden tot artefactuele positieve reacties, zoals reacties die bovenmatige cytotoxiciteit (zie punt 20) voortbrengen, neerslag in het kweekmedium (zie punt 21) of uitgesproken wijzigingen in pH of osmolaliteit (zie punt 5). Indien de teststof op het ogenblik van toevoeging een uitgesproken wijziging in de pH van het medium veroorzaakt, kan de pH worden aangepast door het uiteindelijke behandelingsmedium te bufferen zodat artefactuele positieve reacties worden vermeden en passende kweekomstandigheden in stand worden gehouden.

18. De concentraties worden gekozen op basis van de cytotoxiciteit en andere overwegingen (zie punten 20-22). Hoewel de evaluatie van cytotoxiciteit in een eerste test nuttig kan zijn om de in het hoofdexperiment te gebruiken concentraties beter te kunnen vaststellen, is een eerste test niet vereist. Ook als er wel een voorevaluatie van cytotoxiciteit wordt uitgevoerd, moet in het hoofdexperiment nog steeds voor elke cultuur de cytotoxiciteit worden gemeten. De cytotoxiciteit moet worden beoordeeld aan de hand van de RS, d.w.z. de kloneringsefficiëntie (cloning efficiency of CE) van onmiddellijk na de behandeling uitgeplate cellen, gecorrigeerd voor eventueel verlies van cellen gedurende de behandeling, op basis van het aantal cellen, vergeleken met de gecorrigeerde kloneringsefficiëntie in negatieve controles (waaraan een overleving van 100 % wordt toegekend) (zie aanhangsel 2 voor de formule).

19. Er moeten ten minste vier testconcentraties (exclusief het oplosmiddel en positieve controles) die voldoen aan de aanvaardbaarheidscriteria (passende mate van cytotoxiciteit, aantal cellen enz.), worden geëvalueerd. Hoewel het gebruik van duploculturen raadzaam is, kan bij elke geteste concentratie één behandelde cultuur worden gebruikt, maar ook duploculturen. De resultaten verkregen in de onafhankelijke duploculturen bij een gegeven concentratie moeten afzonderlijk worden gerapporteerd, maar kunnen voor de gegevensanalyse worden gepoold (17). Voor teststoffen die weinig of geen cytotoxiciteit vertonen, zijn intervallen tussen de testconcentraties van ongeveer een factor 2 tot 3 doorgaans passend. Wanneer er cytotoxiciteit optreedt, moeten de geselecteerde testconcentraties een interval bestrijken van een concentratie waarbij cytotoxiciteit optreedt tot concentraties waarbij er matige en geen of vrijwel geen cytotoxiciteit is. Veel teststoffen vertonen een steile concentratie-responscurve, en om het hele cytotoxiciteitsbereik te bestrijken of in detail de concentratie-responsrelatie te bestuderen

zullen mogelijk dichter bij elkaar liggende concentraties en meer dan vier concentraties moeten worden gebruikt, in het bijzonder in situaties waarin een herhalingsexperiment vereist is (zie punt 43). Vooral bij gebruik van één cultuur kan het van belang zijn om meer dan vier concentraties te gebruiken.

20. Als de maximale concentratie is gebaseerd op cytotoxiciteit, moet voor de hoogste concentratie worden gestreefd naar een RS tussen 20 en 10 %. Bij de interpretatie van positieve resultaten moet ervoor worden gezorgd dat deze niet alleen bij 10 % RS of lager worden gevonden (punt 43).

21. Voor slecht oplosbare teststoffen die bij concentraties onder de oplosbaarheidsgrens niet cytotoxisch zijn, moet de hoogste geanalyseerde concentratie troebelheid of een met het oog of met behulp van een omgekeerde microscoop aan het eind van de behandeling met de teststof zichtbaar neerslag opleveren. Zelfs indien cytotoxiciteit optreedt boven de oplosbaarheidsgrens, is het raadzaam de test uit te voeren bij slechts één concentratie die troebelheid of een zichtbaar neerslag oplevert, omdat het neerslag kan leiden tot artefactuele effecten. Bij de concentratie die neerslag oplevert, moet ervoor worden gezorgd dat het neerslag de uitvoering van de test niet verstoort. Het kan nuttig zijn om voorafgaand aan het experiment de oplosbaarheid in het kweekmedium te bepalen.

22. Indien geen neerslag of beperkende cytotoxiciteit wordt waargenomen, moet de hoogste testconcentratie overeenkomen met de laagste van de volgende waarden: 10 mM, 2 mg/ml of 2 µl/ml (39) (40). Wanneer de samenstelling van de teststof niet vastgesteld is, bv. in geval van een stof van onbekende of variabele samenstelling, complexe reactieproducten of biologisch materiaal (d.w.z. Chemical Substances of Unknown or Variable Composition of UVCB's) (41), milieu-extracten enz., moet de hoogste concentratie bij het ontbreken van voldoende cytotoxiciteit mogelijk hoger zijn (bv. 5 mg/ml) om de concentratie van elk van de componenten te verhogen. Er zij echter opgemerkt dat deze eisen voor geneesmiddelen voor menselijk gebruik anders kunnen zijn (42).

Controles

23. Voor elk experimentele omstandigheid dienen gelijktijdige negatieve controles (zie punt 16) in het experiment te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel wordt toegediend en die verder op dezelfde manier worden behandeld als de culturen met teststof.

24. Gelijktijdige positieve controles zijn nodig om aan te tonen dat het laboratorium in staat is om onder de omstandigheden van het gebruikte testprotocol en de doeltreffendheid van het exogene metabole activeringssysteem, indien van toepassing, mutagenen te identificeren. Voorbeelden van voor positieve controle gebruikte stoffen worden gegeven in tabel 1 hieronder. Er kunnen ook alternatieve positieve controlestoffen worden gebruikt, indien dat wordt gemotiveerd. Omdat in-vitrogenotoxiciteitstests op zoogdiercellen voldoende

gestandaardiseerd zijn, kunnen behandelingen met en zonder exogene metabole activering worden toegepast, met alleen een positieve controle waarvoor metabole activering nodig is. In dat geval zal deze ene positievecontrolerespons zowel de activiteit van het metabole activeringssysteem als de gevoeligheid van het testsysteem aantonen. Elke positieve controle moet worden gebruikt bij een of meer concentraties waarvoor een reproduceerbare en detecteerbare stijging ten opzichte van het achtergrondniveau kan worden verwacht, om de gevoeligheid van het testsysteem aan te tonen, en de respons mag niet in het gedrang komen door een mate van cytotoxiciteit die de in deze testmethode gespecificeerde grenzen overschrijdt (zie punt 20).

Tabel 1: Aanbevolen referentiestoffen voor het beoordelen van de bekwaamheid van laboratoria en voor het selecteren van positieve controles.

Metabole activering	**Locus**	**Stof en CAS-nr.**
Zonder exogene metabole activering	*Hprt*	Ethylmethaansulfonaat [CAS-nr. 62-50-0] Ethylnitrosoureum [CAS-nr. 759-73-9] 4-Nitrochinoline-1-oxide [CAS-nr. 56-57-5]
	xprt	Streptonigrine [CAS-nr. 3930-19-6] Mitomycine C [CAS-nr. 50-07-7]
Met exogene metabole activering	*Hprt*	3-Methylcholantreen [CAS-nr. 56-49-5] 7,12-Dimethylbenzantraceen [CAS-nr. 57-97-6] Benzo[*a*]pyreen [CAS-nr. 50-32-8]
	xprt	Benzo[*a*]pyreen [CAS-nr. 50-32-8]

PROCEDURE

Behandeling met teststof

25. Delende cellen worden zowel met als zonder metabool activeringssysteem met de teststof behandeld. De blootstelling moet gedurende een geschikte periode worden uitgevoerd (meestal is 3 tot 6 uur voldoende).

26. Het minimale aantal cellen dat voor elke testcultuur (controle en behandeld) in elke fase van de test wordt gebruikt, moet worden gekozen op basis van de spontane mutantfrequentie. Een vuistregel is om voldoende cellen te behandelen en over te enten om het aantal spontane mutanten in elke cultuur in alle fasen van de test op 10 te houden (17). De spontane mutantfrequentie ligt meestal tussen de 5 en 20 x 10^{-6}. Met een spontane mutantfrequentie van 5 x 10^{-6} en om ook voor de culturen die worden behandeld met concentraties die tijdens de behandeling 90 % cytotoxiciteit veroorzaken (10 % RS), het aantal spontane mutanten voldoende te houden (10 of meer), moeten er ten minste 20 x 10^{6} cellen worden behandeld. Bovendien moeten er tijdens de expressieperiode voldoende

cellen (nooit minder dan 2 miljoen) worden gekweekt en uitgeplaat voor het selecteren van de mutanten (17).

Fenotypische expressietijd en meting van de mutantfrequentie

27. Na de behandelperiode worden de cellen gekweekt om expressie van het mutantfenotype mogelijk te maken. Doorgaans zijn minimaal 7 tot 9 dagen voldoende voor een vrijwel optimale fenotypische expressie van de geïnduceerde Hprt- en xprt-mutanten (43) (44). Tijdens deze periode worden de cellen regelmatig overgeënt om een exponentiële groei te behouden. Na de fenotypische expressie worden de cellen opnieuw uitgeplaat in medium met en zonder de selecterende stof (6-thioguanine) om respectievelijk het aantal mutanten en de kloneringsefficiëntie op het moment van selecteren te bepalen. Hiervoor kunnen schaaltjes worden gebruikt voor monolaagculturen of microtiterplaten voor cellen in suspensie. Voor het selecteren van de mutanten moeten de cellen worden uitgeplaat met een zodanige dichtheid dat de mutanten optimaal geïsoleerd kunnen worden (d.w.z. dat metabole coöperatie wordt vermeden) (17). De platen worden zo lang geïncubeerd als nodig is voor een optimale koloniegroei (bv. 7-12 dagen), waarna de kolonies worden geteld. De mutantfrequentie wordt bepaald aan de hand van het aantal mutantkolonies, gecorrigeerd voor de kloneringsefficiëntie op het moment van selecteren van de mutanten (zie aanhangsel 2 voor formules).

Bekwaamheid van het laboratorium

28. Om voldoende ervaring met de test op te bouwen vooraleer wordt overgegaan tot routinematig gebruik, moet het laboratorium een reeks experimenten hebben verricht met positieve controlestoffen die via verschillende mechanismen werken (ten minste één die actief is met en één die actief is zonder metabole activering, gekozen uit de stoffen die zijn opgesomd in tabel 1) en met verschillende negatieve controles (met verschillende oplosmiddelen/vehicula). Deze positieve en negatieve controleresponsen moeten in overeenstemming zijn met de literatuur. Dit geldt niet voor laboratoria die ervaring hebben, d.w.z. die beschikken over referentiegegevens uit het verleden zoals omschreven in de punten 30 tot en met 33.

29. Er moet er een selectie van positieve controlestoffen (zie tabel 1 in punt 25) zowel met als zonder metabole activering worden onderzocht om te bewijzen dat het laboratorium bekwaam is in het detecteren van mutagene chemische stoffen, de doeltreffendheid van het metabole-activeringssysteem te bepalen en de geschiktheid van de celgroeiomstandigheden tijdens behandeling, fenotypische expressie en selectie van de mutanten en de geschiktheid van de scoringsprocedures aan te tonen. Er moet een bereik van concentraties van de geselecteerde stoffen worden gekozen dat reproduceerbare en concentratiegerelateerde stijgingen tot boven het achtergrondniveau oplevert, om de gevoeligheid en het dynamisch bereik van het testsysteem aan te tonen.

Controlegegevens uit het verleden

30. Het laboratorium stelt vast:

- een historisch bereik en historische spreiding voor de positieve controles;
- een historisch bereik en historische spreiding voor de negatieve controles (met onbehandelde controlestoffen of oplosmiddelen).

31. Wanneer voor het eerst gegevens worden verkregen voor een verdeling van negatieve controles uit het verleden, moeten gelijktijdige negatieve controles consistent zijn met gepubliceerde controlegegevens (22). Naarmate meer gegevens uit experimenten aan de controlespreiding worden toegevoegd, dienen gelijktijdige negatieve controles idealiter binnen de controlegrens van 95 % voor die spreiding te vallen (17) (45) (46).

32. De databank met gegevens over negatieve controles uit het verleden van het laboratorium moet aanvankelijk worden samengesteld op basis van minimaal 10 experimenten, maar bestaat bij voorkeur uit ten minste 20 experimenten die onder vergelijkbare experimentele omstandigheden werden uitgevoerd. Laboratoria dienen methoden voor kwaliteitscontrole, zoals regelkaarten (bv. C-kaart of X-kaart (47)), te gebruiken om na te gaan hoe variabel hun gegevens over positieve en negatieve controles zijn en om aan te tonen dat zij de methodologie "onder controle" hebben (46). Verdere aanbevelingen voor het samenstellen en gebruiken van de gegevens uit het verleden (d.w.z. criteria voor het opnemen van gegevens in en het uitsluiten ervan uit de historische gegevens en de aanvaardbaarheidscriteria voor een gegeven experiment) zijn te vinden in de literatuur (45).

33. Negatieve controlegegevens moeten bestaan uit de mutantfrequenties van enkelvoudige of bij voorkeur duploculturen zoals beschreven in punt 23. Gelijktijdige negatieve controles liggen idealiter binnen de 95 %-controlegrenzen van de verdeling van de databank met historische negatieve controlegegevens van het laboratorium (17) (45) (46). Wanneer gegevens van gelijktijdige negatieve controles buiten de 95 %-controlegrens vallen, kan opneming ervan in de historische controleverdeling toch aanvaardbaar zijn zolang deze gegevens geen extreme uitschieters zijn en er bewijs is dat het testsysteem "onder controle" is (zie hierboven) en er geen bewijs is van technisch of menselijk falen.

34. Bij eventuele wijzigingen in het experimentele protocol moet rekening worden gehouden met hun consistentie met de bestaande databanken met historische controlegegevens van het laboratorium. Eventuele grote inconsistenties moeten leiden tot de oprichting van een nieuwe databank met historische controlegegevens.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Presentatie van de resultaten

35. In de presentatie van de resultaten moeten alle gegevens worden opgenomen die nodig zijn om de cytotoxiciteit (uitgedrukt als RS) te berekenen. De gegevens voor zowel behandelde als controleculturen moeten het volgende bevatten: het aantal cellen aan het eind van de behandeling, het aantal onmiddellijk na behandeling uitgeplate cellen en het aantal kolonies (of het aantal putjes zonder kolonies voor de microtiterplaatmethode). De RS voor elke cultuur moet worden uitgedrukt als percentage van de gelijktijdige oplosmiddelcontrole (zie voor definities aanhangsel 1).

36. In de presentatie van de resultaten moeten bovendien alle gegevens worden opgenomen die nodig zijn om de mutantfrequentie te berekenen. De gegevens voor zowel behandelde als controleculturen moeten het volgende bevatten: 1) het aantal uitgeplate cellen met en zonder selecterende stof (op het moment dat de cellen worden uitgeplaat voor het selecteren van de mutanten), en 2) het aantal getelde kolonies (of het aantal putjes zonder kolonies voor de microtiterplaatmethode) van de platen met en zonder selecterende stof. De mutantfrequentie wordt bepaald aan de hand van het aantal mutantkolonies (op de platen met selecterende stof), gecorrigeerd voor de kloneringsefficiëntie (van de platen zonder selecterende stof). De mutantfrequentie moet worden uitgedrukt als het aantal mutantcellen per miljoen levensvatbare cellen (zie voor definities aanhangsel 1).

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

Aanvaardbaarheidscriteria

38. Aanvaarding van een test geschiedt aan de hand van de volgende criteria:

- toevoeging van de gelijktijdige negatieve controle aan de databank met historische negatieve controlegegevens van het laboratorium zoals beschreven in punt 33 wordt aanvaardbaar geacht;
- gelijktijdige positieve controles (zie punt 24) moeten reacties induceren die verenigbaar zijn met de reacties in de databank met historische positieve controlegegevens en moeten een statistisch significante toename opleveren vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle;
- er zijn twee experimentele omstandigheden (d.w.z. met en zonder metabole activering) onderzocht, tenzij één tot positieve resultaten leidde (zie punt 25);
- er kan een afdoend aantal cellen en concentraties worden geanalyseerd (punten 25, 26 en 19);
- de criteria voor de selectie van de hoogste concentratie zijn consistent met de criteria beschreven in de punten 20, 21 en 22.

Beoordeling en interpretatie van resultaten

39. Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt de teststof als duidelijk positief beschouwd als in een of meer van de onderzochte experimentele omstandigheden:

- ten minste één van de testconcentraties een statistisch significante toename vertoont vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle;
- de toename concentratiegerelateerd is bij evaluatie met een geschikte trendtoets;
- een of meer van de resultaten buiten de verdeling van de historische negatieve controlegegevens vallen (bv. op Poisson-verdeling gebaseerde 95 %-controlegrens; zie punt 33).

Wanneer aan al deze criteria is voldaan, wordt de teststof in staat geacht in gekweekte zoogdiercellen in dit testsysteem genmutaties te induceren. Aanbevelingen voor de meest geschikte statistische methoden zijn te vinden in de literatuur (46) (48).

40. Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt een teststof als duidelijk negatief beschouwd als in alle onderzochte experimentele omstandigheden:

- geen van de testconcentraties een statistisch significante toename vertoont vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle;
- er geen concentratiegerelateerde toename is bij evaluatie met een geschikte trendtoets;
- alle resultaten binnen de verdeling van de historische negatieve controlegegevens vallen (bv. op Poisson-verdeling gebaseerde 95 %-controlegrens; zie punt 33).

De teststof wordt dan niet in staat geacht in gekweekte zoogdiercellen in dit testsysteem genmutaties te induceren.

41. Een duidelijk positieve of negatieve reactie behoeft niet te worden bevestigd.

42. In gevallen waarin de reactie noch duidelijk negatief noch duidelijk positief is zoals hierboven beschreven, of om de biologische relevantie van een resultaat te helpen vaststellen, moeten de gegevens door een deskundige en/of nader onderzoek worden beoordeeld. Het uitvoeren van een herhalingsexperiment onder mogelijk aangepaste experimentele omstandigheden (bv. concentratie-intervallen, andere omstandigheden bij metabole activering (d.w.z. S9-concentratie of S9-herkomst)) kan nuttig zijn.

43. In zeldzame gevallen zal op basis van de gegevens, zelfs na nader onderzoek, niet kunnen worden geconcludeerd dat de resultaten positief of negatief zijn. De reactie op de teststof moet dan als moeilijk te interpreteren worden beschouwd (geïnterpreteerd als even waarschijnlijk positief als negatief).

Testverslag

44. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

- bron, partijnummer, uiterste gebruiksdatum, indien beschikbaar;
- stabiliteit van de teststof, indien bekend;
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel, indien bekend;
- meting van pH, osmolaliteit en neerslag in het kweekmedium waaraan de teststof werd toegevoegd, indien van toepassing.

Stof die uit één component bestaat:

- fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water en aanvullende relevante fysisch-chemische eigenschappen;
- chemische identificatiegegevens, zoals IUPAC- of CAS-naam, CAS-nummer, SMILES- of InChI-code, structuurformule, zuiverheid, chemische identiteit van onzuiverheden, indien van toepassing en praktisch haalbaar enz.

Stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB's en mengsels:

- voor zover mogelijk, karakterisering aan de hand van chemische identiteit (zie hierboven), kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen van de bestanddelen.

Oplosmiddel:

- motivering van de keuze van het oplosmiddel;
- percentage oplosmiddel in het uiteindelijke kweekmedium.

Cellen:

Voor de voorraadculturen van het laboratorium:

- aard en herkomst van de cellijnen;
- aantal overentingen, indien beschikbaar, en geschiedenis in het laboratorium;
- kenmerken van het karyotype en/of modaal aantal chromosomen;
- methoden om de celculturen in leven te houden;
- afwezigheid van mycoplasma;
- verdubbelingstijden.

Testomstandigheden:

- achtergrond voor de keuze van de concentraties en het aantal culturen, bijvoorbeeld gegevens over de cytotoxiciteit en beperkte oplosbaarheid;
- samenstelling van het medium, CO_2-concentratie, vochtigheidsgraad;

- concentratie van de teststof uitgedrukt als uiteindelijke concentratie in het kweekmedium (bv. µg of mg/ml of mM van kweekmedium);
- toegevoegde concentratie (en/of volume) van het oplosmiddel en de teststof in het kweekmedium;
- incubatietemperatuur;
- incubatietijd;
- duur van de behandeling;
- celdichtheid bij de behandeling;
- aard en samenstelling van het metabool activeringssysteem (bron van S9, methode voor de bereiding van de S9-mix, de concentratie of het volume van de S9-mix en S9 in het uiteindelijke kweekmedium, kwaliteitscontroles van S9);
- positieve en negatieve controlestoffen, uiteindelijke concentraties voor elke behandelingsomstandigheid;
- duur van de expressieperiode (met vermelding van het aantal geënte cellen en schema's voor enting en overenting, indien van toepassing;
- identiteit en concentratie van de selecterende stof;
- criteria voor de aanvaardbaarheid van de tests;
- methoden die zijn gebruikt om het aantal levensvatbare en mutantcellen te bepalen;
- methoden die zijn gebruikt om de cytotoxiciteit te meten;
- eventuele aanvullende informatie die betrekking heeft op de cytotoxiciteit en gebruikte methode;
- duur van de incubatietijden na uitplating;
- criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is;
- gebruikte methoden voor het bepalen van de pH, osmolaliteit en neerslag.

Resultaten:

- aantal behandelde cellen en aantal overgeënte cellen voor elke cultuur;
- metingen van de cytotoxiciteit en eventuele andere waarnemingen;
- tekenen van neerslag en tijdstip van de bepaling;
- aantal uitgeplate cellen in selectief en niet-selectief medium;
- aantal kolonies in niet-selectief medium en aantal resistente kolonies in selectief medium en bijbehorende mutantfrequenties;
- indien mogelijk het verband tussen concentratie en respons;

- gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve (oplosmiddel) en positieve controles (concentraties en oplosmiddelen);
- gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve (oplosmiddel) en positieve controles met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking en betrouwbaarheidsinterval (bv. 95 %), alsook het aantal gegevens;
- statistische analyses (voor afzonderlijke culturen en gepoolde duplo's indien van toepassing), en eventuele p-waarden.

Bespreking van de resultaten.

Conclusie

LITERATUUR

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

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

(3) 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, 1306-1312.

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

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

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

(7) 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, 17-36.

(8) 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, 147-204.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. and Sugimura T. (1976). 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.

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

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

(33) UNEP. (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Beschikbaar op: [http://www.pops.int.html].

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

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

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

(37) 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.

(38) 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. Environ. Mutagen.,5, 795-801.

(39) OESO (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). Op aanvraag verkrijgbaar bij de Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling.

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

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

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

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

(44) Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., and Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. Mutation, Res., 1335(2):121-8.

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

(46) OESO (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 199), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(47) 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.

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

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Chemische stof: een stof of een mengsel.

Concentraties: verwijzen naar uiteindelijke concentraties van de teststof in het kweekmedium.

Cytotoxiciteit: voor de bepalingen bestreken in deze testmethode is cytotoxiciteit gelijkgesteld aan een vermindering van de relatieve overleving van de behandelde cellen vergeleken met de negatieve controle (zie het desbetreffende punt).

Fenotypische expressietijd: de tijd na behandeling waarin de genetische verandering gefixeerd wordt in het genoom en ongewijzigde genproducten verdwijnen zodat het fenotypische kenmerk verandert.

Genotoxisch: een algemene term die alle typen DNA- of chromosoombeschadiging omvat, waaronder DNA-breuken, adductherschikkingen, mutaties, chromosoomafwijkingen en aneuploïdie. Niet alle soorten genotoxische effecten leiden tot mutaties of stabiele chromosoombeschadiging.

HAT-medium: medium dat Hypoxanthine, Aminopterine en Thymidine bevat en dat wordt gebruikt voor het verwijderen van Hprt-mutanten.

Kloneringsefficiëntie: percentage van in lage dichtheid uitgeplate cellen die in staat zijn om uit te groeien tot een kolonie die geteld kan worden.

Mitotische recombinatie: recombinatie tussen homologe chromatiden tijdens de mitose, die mogelijk leidt tot de inductie van breuken in het dubbelstrengig DNA of verlies van heterozygotie.

MPA-medium: medium dat Xanthine, Adenine, Thymidine, Aminopterine en Mycofenolinezuur bevat en dat wordt gebruikt voor het verwijderen van xprt-mutanten.

Mutageen: produceert een erfelijke wijziging van DNA-basenpaarsequentie(s) in genen of van de structuur van chromosomen (chromosoomafwijkingen).

Mutagenen met basenpaarvervanging: chemische stoffen die vervanging van een of meer basenparen in het DNA veroorzaken.

Mutagenen met leesraamverschuiving: chemische stoffen die invoeging of deletie van een of meer basenparen in het DNA-molecuul veroorzaken.

Mutantfrequentie (MF): het aantal waargenomen mutantkolonies gedeeld door het aantal uitgeplate cellen in het selectieve medium, gecorrigeerd voor de kloneringsefficiëntie (of levensvatbaarheid) op het moment van selecteren.

Onbehandelde controle: culturen die geen behandeling ondergaan (d.w.z. noch teststof noch oplosmiddel), maar gelijktijdig met en op dezelfde wijze worden verwerkt als de culturen die de teststof ontvangen.

Oplosmiddelcontrole: algemene term om de controleculturen aan te duiden die uitsluitend het oplosmiddel ontvangen dat wordt gebruikt om de teststof op te lossen.

Relatieve overleving (RS): wordt gebruikt als maat voor behandelingsgerelateerde cytotoxiciteit. De RS is de kloneringsefficiëntie (CE) van onmiddellijk na de behandeling uitgeplate cellen, gecorrigeerd voor eventueel verlies van cellen gedurende de behandeling, vergeleken met de kloneringsefficiëntie in negatieve controles (waaraan een overleving van 100 % wordt toegekend).

S9-leverfractie: supernatant van leverhomogenaat na centrifugering bij 9000 g, d.w.z. ruw leverextract.

S9-mix: mix van de S9-leverfractie en cofactoren die nodig zijn voor de metabole enzymactiviteit.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

UVCB: chemische stoffen waarvan de samenstelling niet bekend of variabel is, complexe reactieproducten of biologische materialen.

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.

Aanhangsel 2

FORMULES VOOR DE BEOORDELING VAN CYTOTOXICITEIT EN MUTANTFREQUENTIE

De cytotoxiciteit wordt beoordeeld aan de hand van de relatieve overleving, d.w.z. de kloneringsefficiëntie (CE) van onmiddellijk na de behandeling uitgeplate cellen, gecorrigeerd voor eventueel verlies van cellen gedurende de behandeling, vergeleken met de gecorrigeerde kloneringsefficiëntie in negatieve controles (waaraan een overleving van 100 % wordt toegekend) (zie formule voor RS hieronder).

De gecorrigeerde CE voor een met een teststof behandelde cultuur wordt berekend als:

$$\text{Gecorrigeerde CE} = \frac{\text{Aantal cellen aan het einde van de behandeling}}{\text{Aantal cellen aan het begin van de behandeling}}$$

De RS voor een met een teststof behandelde cultuur wordt berekend als:

$$\text{RS} = \frac{\text{Gecorrigeerde CE in behandelde cultuur}}{\text{Gecorrigeerde CE in de oplosmiddelcontrole}} \times 100$$

De mutantfrequentie is de kloneringsefficiëntie van mutantkolonies in selectief medium gedeeld door de kloneringsefficiëntie in niet-selectief medium gemeten voor dezelfde cultuur op het moment van selecteren.

$$\text{Mutantfrequentie} = \frac{\text{Kloneringsefficiëntie van mutantkolonies in selectief medium}}{\text{Kloneringsefficiëntie in niet} - \text{selectief medium}}$$

Wanneer voor de kloneringsefficiëntie platen worden gebruikt:

CE = aantal kolonies / aantal uitgeplate cellen.

Wanneer voor de kloneringsefficiëntie microtiterplaten worden gebruikt:

Het aantal kolonies per putje in microtiterplaten volgt een Poisson-verdeling.

CE = -LnP(0) / aantal uitgeplate cellen per putje

Waarbij -LnP(0) het waarschijnlijke aantal lege putjes is van de geënte putjes en wordt beschreven door de volgende formule:

LnP(0)= -Ln (aantal lege putjes / aantal geënte putjes).".

3) In deel B wordt hoofdstuk B.22 vervangen door:

"B.22 ONDERZOEK NAAR DOMINANTE LETALE MUTATIES BIJ KNAAGDIEREN

INLEIDING

1. Deze testmethode (TM) is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 478 (2016) van de OESO. Testmethoden worden periodiek herzien in het licht van de wetenschappelijke vooruitgang, veranderende regelgevingsbehoeften en overwegingen met het oog op dierenwelzijn. In deze gewijzigde versie van de testmethode is meer dan dertig jaar ervaring met dit onderzoek verwerkt, alsook het potentieel om dit onderzoek te integreren in of te combineren met andere toxiciteitsonderzoeken zoals onderzoeken naar ontwikkelingstoxiciteit, reproductietoxiciteit of genotoxiciteit. Vanwege de beperkingen ervan en het gebruik van een groot aantal dieren is deze bepaling echter niet bestemd om als primaire methode te worden gebruikt, maar veeleer als aanvullende testmethode die alleen mag worden gebruikt als er geen alternatief is om aan wettelijke voorschriften te voldoen. Door toxiciteitstests te combineren hoeven mogelijk veel minder dieren in toxiciteitstests te worden gebruikt. De OESO heeft een document opgesteld met beknopte informatie over genetisch-toxicologische tests en een overzicht van de recente wijzigingen van de OESO-testrichtlijnen voor genetische toxiciteit (1).

2. Het doel van het onderzoek naar dominante letale (DL) mutaties is om na te gaan of chemische stoffen mutaties veroorzaken die tot chromosoomafwijkingen in kiemcellen leiden. Bovendien is de DL-test van belang voor de beoordeling van genotoxiciteit, omdat factoren van het in-vivometabolisme, de farmacokinetiek en de DNA-herstelprocessen actief zijn en bijdragen aan de reactie op de test, hoewel deze aspecten per soort kunnen verschillen. De inductie van een DL-mutatie door blootstelling aan een teststof wijst erop dat de stof het geslachtsweefsel van het proefdier heeft aangetast.

3. DL-mutaties veroorzaken de dood van het embryo of van de foetus. De inductie van een DL-mutatie door blootstelling aan een teststof wijst erop dat de stof de kiemcellen van het proefdier heeft aangetast.

4. Een DL-bepaling is nuttig ter bevestiging van positieve resultaten van tests met somatische in-vivo-eindpunten en is een relevant eindpunt ter voorspelling van gevaren voor de mens en het risico van genetische ziekten die worden overgedragen via de kiembaan. Deze bepaling vergt echter een groot aantal dieren en is arbeidsintensief; daarom is de uitvoering ervan heel duur en tijdrovend. Omdat de spontane frequentie van DL-mutaties tamelijk hoog is, is de gevoeligheid van deze bepaling voor het detecteren van kleine toenamen in de frequentie van mutaties over het algemeen beperkt.

5. De definities van kernbegrippen worden uiteengezet in aanhangsel 1.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

6. De test wordt meestal uitgevoerd bij muizen (2) (3) (4) maar in sommige gevallen kunnen andere diersoorten, zoals ratten (5) (6) (7) (8), geschikt zijn indien wetenschappelijk gerechtvaardigd. DL-mutaties zijn doorgaans het gevolg van grove chromosoomafwijkingen (structurele en numerieke anomalieën) (9) (10) (11) maar genmutaties kunnen niet worden uitgesloten. Een DL-mutatie is een mutatie die in een kiemcel op zichzelf optreedt of na de bevruchting in het jonge embryo gefixeerd wordt, en die niet tot dysfunctie van de gameet leidt, maar dodelijk is voor de bevruchte eicel of het zich ontwikkelende embryo.

7. Men laat individuele mannetjes opeenvolgend en met geschikte intervallen paren met nog niet-gedekte vrouwtjes. Het aantal paringen na de behandeling is afhankelijk van het uiteindelijke doel van het DL-onderzoek (punt 23) en moet voldoende zijn om te zorgen dat alle fasen van de rijping van mannelijke kiemcellen op DL's worden beoordeeld (12).

8. Als er aanwijzingen zijn dat de teststof, of een of meer metabolieten daarvan, niet in de testis terechtkomt, is deze test niet geschikt.

PRINCIPE VAN DE TEST

9. In het algemeen worden mannetjes langs een geschikte weg aan de teststof blootgesteld en met niet-behandelde, niet-gedekte vrouwtjes gepaard. Door middel van geregelde intervallen in de paring kunnen verschillende typen kiemcellen worden onderzocht. Een passende tijd na de paring worden de vrouwtjes gedood en wordt hun uterus onderzocht om het aantal implantaten en het aantal dode en levende embryo's te bepalen. De dominante letaliteit van een teststof wordt bepaald door de levende implantaties per vrouwtje in de behandelde groep te vergelijken met de levende implantaten per vrouwtje in de vehiculum-/oplosmiddelcontrolegroep. 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 door de teststof geïnduceerde verlies na implantatie weer. Het verlies na implantatie wordt berekend door de verhouding te bepalen tussen het aantal dode implantaten en het totale aantal implantaten in de behandelde groep vergeleken met dezelfde verhouding bij de controlegroep. Het verlies voor implantatie kan worden geschat door de tellingen van de corpora lutea minus het totale aantal implantaten, of het totale aantal implantaten per vrouwtje in de behandelde en de controlegroep met elkaar te vergelijken.

VERIFICATIE VAN DE BEKWAAMHEID VAN LABORATORIA

10. Laboratoria tonen aan bekwaam te zijn in deze bepaling als zij bewijzen in staat te zijn DL-frequenties uit gepubliceerde gegevens (bv. (13) (14) (15) (16) (17) (18)) te

reproduceren met positieve controlestoffen (waaronder zwakke responsen) zoals de stoffen vermeld in tabel 1 en mediumcontroles en negatieve controlefrequenties te verkrijgen die consistent zijn met het aanvaardbare gegevensbereik (zie bovenstaande referenties) of met de historische controleverdeling van het laboratorium, indien beschikbaar.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Voorbereidingen

Keuze van de diersoort

11. Er moet gebruik worden gemaakt van gezonde geslachtsrijpe dieren van in het laboratorium gangbare stammen. Meestal worden muizen gebruikt, maar ratten kunnen ook geschikt zijn. Een andere geschikte zoogdiersoort kan ook in aanmerking komen, mits in het verslag een wetenschappelijke motivering wordt gegeven.

Huisvestings- en voedingsomstandigheden van de dieren

12. De temperatuur in de proefdierruimte moet voor knaagdieren 22 °C (±3 °C) zijn. Hoewel de relatieve vochtigheid idealiter 50-60 % is, moet deze minimaal 40 % en bij voorkeur niet hoger dan 70 % zijn, behalve bij het reinigen van de ruimte. Verlichting gebeurt met kunstlicht met een ritme van 12 uur licht gevolgd door 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater. De keuze van het voer kan worden beïnvloed door de noodzaak om voor een afdoende mengbaarheid met de teststof te zorgen, wanneer de stof via het voer wordt toegediend. Voorafgaand aan de behandeling of de paring moeten de knaagdieren worden gehuisvest in kleine groepen (van niet meer dan vijf dieren) van hetzelfde geslacht als geen agressief gedrag wordt verwacht of waargenomen, bij voorkeur in stevige kooien met passende milieuverrijking. De dieren kunnen individueel worden gehuisvest als dat wetenschappelijk gerechtvaardigd is.

Voorbereiding van de dieren

13. Gezonde en geslachtsrijpe volwassen mannetjes en vrouwtjes worden aselect ingedeeld in de controle- en behandelgroepen. De afzonderlijke dieren krijgen op humane, minimaal invasieve wijze een unieke identificatie (bv. door het aanbrengen van een ring, tag, microchip of door biometrische identificatie, maar niet door het afknippen van tenen of oren) en krijgen minimaal vijf dagen de tijd om in het laboratorium te acclimatiseren. De kooien worden zodanig geplaatst dat mogelijke effecten door de plaatsing van de kooi tot een minimum worden beperkt. Kruisverontreiniging door de positieve controle en de teststof moet worden vermeden. Bij aanvang van het onderzoek moet het gewichtsverschil tussen de dieren zo klein mogelijk zijn en mag dit maximaal ± 20 % van het gemiddelde gewicht van elk geslacht bedragen.

Voorbereiding van de doses

14. Vaste chemische teststoffen moeten worden opgelost of gesuspendeerd in geschikte oplosmiddelen of vehicula of worden vermengd met voedsel of drinkwater voordat dit aan de dieren wordt gegeven. Vloeibare chemische teststoffen kunnen direct worden gegeven of eerst worden verdund. Voor blootstelling via inhalatie kunnen teststoffen worden toegediend als gas, damp of een vaste/vloeibare aerosol, naargelang van de fysisch-chemische eigenschappen ervan. Er dienen verse preparaten van de teststof te worden toegepast, tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat bewaren van de preparaten aanvaardbaar is en blijkt wat de juiste bewaaromstandigheden zijn.

Testomstandigheden

Oplosmiddel/vehiculum

15. Het oplosmiddel/vehiculum mag bij de gebruikte dosisvolumes geen toxische effecten veroorzaken en chemische reacties met de chemische teststof moeten uitgesloten zijn. Als andere oplosmiddelen/vehicula worden gebruikt dan de algemeen bekende, moet het gebruik ervan worden ondersteund met referentiegegevens die wijzen op de verenigbaarheid ervan. Het wordt aanbevolen waar mogelijk eerst het gebruik van een waterig oplosmiddel/vehiculum te overwegen. Voorbeelden van vaak gebruikte compatibele oplosmiddelen/vehicula zijn water, fysiologische zoutoplossing, methylcelluloseoplossing, natriumcarboxymethylcellulose-zoutoplossing, olijfolie en maïsolie.

Positieve controles

16. Er moeten altijd tegelijkertijd positievecontroledieren worden gebruikt, tenzij het laboratorium aantoonbare bekwaamheid heeft in het uitvoeren van de test en de test in het recente verleden (bv. de afgelopen 5 jaar) routinematig heeft uitgevoerd. Het is echter niet nodig om de dieren voor de positieve controle via dezelfde toedieningsroute te behandelen als de dieren die de teststof krijgen, of om monsters te nemen voor alle intervallen in de paring. Van de positieve controlestoffen moet bekend zijn dat ze onder de voor de test gebruikte omstandigheden DL's veroorzaken. Afgezien van de behandeling moeten de dieren in de controlegroepen op identieke wijze worden behandeld als de dieren in de andere groepen.

17. De doses van de positieve controlestoffen dienen zodanig te worden gekozen, dat zwakke of matige effecten worden geproduceerd waarmee de prestatie en gevoeligheid van de bepaling kritisch worden beoordeeld, maar die wel altijd positieve dominante letale effecten veroorzaken. Voorbeelden van positieve controlestoffen en geschikte doses staan vermeld in tabel 1.

Tabel 1: Voorbeelden van positieve controlestoffen.

Stof [CAS-nr.] (referentienr.)	**Effectief doseringsbereik (mg/kg) (knaagdiersoort)**	**Toedieningsperiode (dagen)**
Triëthyleenmelamine [51-18-3] (15)	0,25 (muizen)	1
Cyclofosfamide [50-18-0] (19)	50-150 (muizen)	5
Cyclofosfamide [50-18-0] (5)	25-100 (ratten)	1
Ethylmethaansulfonaat [62-50-0] (13)	100-300 (muizen)	5
Acrylamide-monomeer [79-06-1] (17)	50 (muizen)	5
Chlorambucil [305-03-3] (14)	25 (muizen)	1

Negatieve controles

18. Voor elk monsternamepunt moeten er dieren voor negatieve controle worden meegenomen die zijn behandeld met alleen oplosmiddel of vehiculum en verder op dezelfde wijze als de behandelgroepen (20). Bij het ontbreken van historische of gepubliceerde controlegegevens waaruit blijkt dat het gekozen oplosmiddel/vehiculum geen DL's of andere schadelijke effecten induceert, moeten er voor elk monsternamepunt ook onbehandelde controledieren worden meegenomen om vast te stellen dat de vehiculumcontrole aanvaardbaar is.

PROCEDURE

Aantal dieren

19. Men laat individuele mannetjes opeenvolgend en met geschikte, vooraf bepaalde intervallen (bv. wekelijkse intervallen, punten 21 en 23) paren met bij voorkeur één nog niet-gedekt vrouwtje. Het aantal mannetjes per groep moet vooraf zodanig worden bepaald dat het voldoende is (in combinatie met het aantal gedekte vrouwtjes voor elk paringsinterval) voor het benodigde statistisch onderscheidingsvermogen om ten minste een verdubbeling van de DL-frequentie te kunnen detecteren (punt 44).

20. Het aantal vrouwtjes per paringsinterval moet ook vooraf worden bepaald aan de hand van berekeningen van het statistisch onderscheidingsvermogen dat nodig is om ten minste een verdubbeling van de DL-frequentie te kunnen detecteren (d.w.z. voldoende drachtige vrouwtjes voor in totaal ten minste 400 implantaten) (20) (21) (22) (23) en zodat ten

minste één dood implantaat per analyse-eenheid (d.w.z. paringsgroep per dosering) verwacht wordt (24).

Toedieningsperiode en paringsintervallen

21. Het aantal paringsintervallen na de behandeling is afhankelijk van het behandelingsschema en moet groot genoeg zijn om alle fasen van de rijping van mannelijke kiemcellen na de behandeling te beoordelen op DL-inductie (12) (25). Voor één behandeling waarbij dagelijks tot vijf doses worden toegediend, moeten er na de laatste behandeling 8 (muizen) of 10 (ratten) paringen plaatsvinden met intervallen van een week. Voor toediening van meerdere doses kan het aantal paringsintervallen evenredig worden teruggebracht met de toegenomen duur van de toedieningsperiode, waarbij echter wel wordt vastgehouden aan het doel om alle fasen van de spermatogenese te beoordelen (bv. bij muizen kan na een blootstelling van 28 dagen worden volstaan met slechts 4 paringen per week om alle fasen van de spermatogenese te beoordelen). Alle behandelings- en paringsschema's moeten wetenschappelijk verantwoord worden.

22. De vrouwtjes moeten bij de mannetjes worden gelaten gedurende ten minste één volledige oestruscyclus (bij muizen en ratten komt bijvoorbeeld één week overeen met één oestruscyclus). Vrouwtjes die in een eenweeks interval niet gepaard hebben kunnen voor een volgend paringsinterval worden gebruikt. Of de vrouwtjes blijven bij de mannetjes 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.

23. Het gebruikte blootstellings- en paringsschema is afhankelijk van het uiteindelijke doel van het DL-onderzoek. Als het doel is om te bepalen of een bepaalde chemische stof op zichzelf DL-mutaties induceert, behelst de aanvaarde methode de blootstelling van een volledige spermatogenesecyclus (bv. 7 weken bij muizen, 5-7 behandelingen per week) en één paring aan het einde daarvan. Is het doel echter om het type kiemcel vast te stellen dat gevoelig is voor DL-inductie, dan gaat de voorkeur uit naar een enkele blootstelling of een blootstelling van 5 dagen, gevolg door wekelijkse paring.

Dosisniveaus

24. Als er een voorbereidend bereikbepalingsonderzoek wordt uitgevoerd omdat er nog 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 (26). Het onderzoek moet erop gericht zijn de maximaal verdraagbare dosis (maximum tolerated dose, MTD) vast te stellen, dat wil zeggen, de hoogste dosis die zal worden verdragen zonder aanwijzingen voor onderzoeksbeperkende toxiciteit, in verhouding tot de duur van de onderzoeksperiode (bv. afwijkend gedrag of afwijkende reacties, licht gewichtsverlies of cytotoxiciteit voor het

hematopoïetisch systeem), maar geen dood of aanwijzingen voor pijn, lijden of nood die humane doding noodzakelijk maken (27).

25. De MTD mag ook geen negatieve invloed hebben op het succes van de paring (21).

26. Teststoffen met specifieke biologische activiteit bij lage niet-toxische doses (zoals hormonen en mitogenen) en chemische stoffen die verzadiging van toxicokinetische eigenschappen vertonen kunnen uitzonderingen zijn op de doseringscriteria en moeten per geval worden beoordeeld.

27. Om dosisresponsinformatie te krijgen, moet een volledig onderzoek een negatieve controlegroep omvatten en minimaal drie dosisniveaus die in het algemeen een factor 2, maar niet meer dan een factor 4, uit elkaar liggen. Als in een bereikbepalingsonderzoek of op basis van bestaande gegevens geen aanwijzingen voor toxiciteit van de teststof worden gevonden, moet de hoogste dosis voor een enkele toediening 2 000 mg/kg lichaamsgewicht zijn. Als de teststof echter wel toxiciteit veroorzaakt, moet de MTD de hoogste toegediende dosis zijn en moeten de gebruikte dosisniveaus bij voorkeur een bereik dekken van maximale tot weinig of geen toxiciteit. Voor niet-toxische chemische stoffen is de limietdosis voor een toedieningsperiode van 14 dagen of meer 1000 mg/kg lichaamsgewicht/dag en voor toedieningsperioden van minder dan 14 dagen 2000 mg/kg lichaamsgewicht/dag.

Toediening van de doses

28. Bij de opzet van een bepaling moet rekening worden gehouden met de verwachte blootstellingsroute bij mensen. Daarom kunnen andere blootstellingsroutes zoals voeding, drinkwater, subcutaan, intraveneus, topicaal, inhalatie, oraal (via een sonde) of implantatie worden gekozen, als deze onderbouwd worden. De route moet in elk geval zodanig worden gekozen dat adequate blootstelling van het (de) doelweefsel(s) is gewaarborgd. Intraperitoneale injectie wordt normaal gesproken niet aanbevolen, omdat zij bij mensen geen beoogde blootstellingsroute is, en zij mag uitsluitend worden toegepast met een specifieke wetenschappelijke motivering. Als de teststof wordt vermengd met voedsel of drinkwater, met name in geval van één toediening, moet ervoor worden gezorgd dat de tijdsduur tussen de consumptie van voedsel en water en de paring voldoende is om de effecten te kunnen detecteren (punt 31). Het maximale vloeistofvolume dat via sonde of injectie per keer kan worden toegediend, hangt af van de grootte van het proefdier. Het volume mag normaal gesproken niet groter zijn dan 1 ml/100g lichaamsgewicht. Bij een waterige oplossing kan echter maximaal 2 ml/100g lichaamsgewicht worden gebruikt. Hogere volumes dan dit (mits toegestaan volgens wetgeving inzake dierenwelzijn) moeten worden onderbouwd. Variaties in het testvolume moeten geminimaliseerd worden door het aanpassen van de concentratie zodat op alle dosisniveaus hetzelfde constante volume in verhouding tot het lichaamsgewicht kan worden gebruikt.

Waarnemingen

29. Algemene klinische waarnemingen van de proefdieren moeten ten minste eenmaal per dag plaatsvinden en klinische tekenen moeten ten minste eenmaal per dag worden geregistreerd, bij voorkeur steeds op hetzelfde tijdstip en met inachtneming van de piekperiode van de te verwachten effecten na toediening. Gedurende de doseringsperiode moeten alle dieren ten minste tweemaal per dag worden geobserveerd op ziekteverschijnselen en sterfte. Elk dier moet bij aanvang van het onderzoek en tijdens onderzoeken met herhaalde toediening ten minste eenmaal per week worden gewogen, alsook op het moment dat het dier wordt gedood. Ook het voedselverbruik moet ten minste wekelijks worden gemeten. Als de teststof met het drinkwater wordt toegediend, moet het waterverbruik bij elke verversing van water en ten minste wekelijks worden gemeten. Dieren die niet-letale indicatoren van excessieve toxiciteit vertonen moeten voor afloop van de testperiode worden gedood (27).

Verzameling en verwerking van weefsel

30. De vrouwtjes worden in de tweede helft van de dracht gedood op drachtdag (gestation day, GD) 13 voor muizen en GD 14-15 voor ratten. De uteri worden op dominante letale effecten onderzocht door het aantal implantaten, dode en levende embryo's en corpora lutea te bepalen.

31. De baarmoederhoorns en eierstokken worden blootgelegd voor het tellen van de corpora lutea en de foetussen worden verwijderd, geteld en gewogen. De uteri moeten zorgvuldig worden onderzocht op resorpties die door levende foetussen aan het oog worden onttrokken en om er zeker van te zijn dat alle resorpties geteld worden. De foetale sterfte wordt geregistreerd, alsmede het aantal succesvol bevruchte vrouwtjes en het totale aantal implantaties, het aantal verloren vruchten voor implantatie en de sterfte na implantatie (met inbegrip van vroege en late resorpties). Bovendien kunnen de zichtbare foetussen ten minste 2 weken lang worden geconserveerd in Bouin-fixeermiddel gevolgd door onderzoek naar ernstige uitwendige misvormingen (28) om aanvullende informatie te verkrijgen over de effecten van de teststof op de voortplanting en de ontwikkeling.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verwerking van de resultaten

32. De volgende gegevens moeten in tabellen worden weergegeven: aantal mannetjes dat gepaard heeft, 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 moeten het paringsinterval, het dosisniveau voor de behandelde mannetjes en de aantallen levende implantaten en dode implantaten worden vermeld.

33. Het verlies na implantatie wordt berekend door de verhouding te bepalen tussen het aantal dode implantaten en het totale aantal implantaten in de behandelde groep vergeleken met dezelfde verhouding bij de vehiculum-/oplosmiddelcontrolegroep.

34. Het verlies vóór implantatie wordt berekend als het verschil tussen het aantal corpora lutea en het aantal implantaten of als een daling van het gemiddelde aantal implantaten per vrouwtje in vergelijking met controleparingen. Wanneer het verlies vóór implantatie wordt geschat, moet dat worden gerapporteerd.

35. De Dominante Letale factor wordt geschat als: (sterfte na implantatie/totaal aantal implantaties per vrouwtje) x 100.

36. Gegevens over toxiciteit en klinische tekenen moeten volgens punt 29 worden gemeld.

Aanvaardbaarheidscriteria

37. Voor de aanvaardbaarheid van een test gelden de volgende criteria:

- de gelijktijdige negatieve controle komt overeen met de gepubliceerde normen voor historische negatieve controlegegevens en de historische controlegegevens van het laboratorium indien beschikbaar (zie punten 10 en 18);
- de gelijktijdige positieve controles induceren responsen die overeenkomen met de gepubliceerde normen voor historische positieve controlegegevens en de databank met historische positieve controlegegevens van het laboratorium indien beschikbaar, en leiden tot een statistisch significante toename vergeleken met de negatieve controle (zie punten 17 en 18);
- er zijn een voldoende totaal aantal implantaten en aantal doses geanalyseerd (punt 20);
- de criteria voor de selectie van de hoogste dosis zijn consistent met de criteria beschreven in de punten 24 en 27.

Beoordeling en interpretatie van resultaten

38. Minstens drie behandelde dosisgroepen moeten worden geanalyseerd om voldoende gegevens voor een dosisresponsanalyse te verkrijgen.

39. Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt een teststof als duidelijk positief beschouwd als:

- minstens één van de testdoses een statistisch significante toename vertoont vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle;
- de toename verband houdt met de dosis in ten minste een experimentele omstandigheid (bv. een wekelijks paringsinterval) bij beoordeling met een passende trendtoets; en

- een of meer van de resultaten buiten het aanvaardbare gegevensbereik voor de negatieve controle vallen, of buiten de verdeling van de historische negatieve controlegegevens van het laboratorium (bv. op Poisson-verdeling gebaseerde 95 %-controlegrens), indien beschikbaar.

De teststof wordt dan in staat geacht om DL-mutaties te induceren in de kiemcellen van de proefdieren. Aanbevelingen voor de meest passende statistische methoden worden beschreven in punt 44; andere aanbevolen statistische benaderingen zijn ook terug te vinden in de literatuur (20) (21) (22) (24) (29). De gebruikte statistische toetsen moeten het dier als de proefeenheid beschouwen.

40. Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt een teststof als duidelijk negatief beschouwd als:

- geen van de testdoses een statistisch significante toename vertoont vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle;
- er in geen enkele experimentele omstandigheid een toename gevonden wordt die verband houdt met de dosis; en
- alle resultaten binnen het aanvaardbare gegevensbereik voor de negatieve controle vallen, of binnen de historische negatieve controlegegevens van het laboratorium (bv. op Poisson-verdeling gebaseerde 95 %-controlegrens), indien beschikbaar.

De teststof wordt dan niet in staat geacht om DL-mutaties te induceren in de kiemcellen van de proefdieren.

41. Een duidelijk positieve of een duidelijk negatieve reactie behoeft niet te worden bevestigd.

42. Indien de reactie noch duidelijk negatief noch duidelijk positief is en om de biologische relevantie van een resultaat te helpen vaststellen (bv. een zwakke of zeer lichte toename), moeten de gegevens door een deskundige en/of nader onderzoek op basis van de bestaande testgegevens worden beoordeeld, bijvoorbeeld om nader vast te stellen of het positieve resultaat buiten het aanvaardbare gegevensbereik voor de negatieve controle valt, of buiten de historische negatieve controlegegevens van het laboratorium (30).

43. In zeldzame gevallen zal op basis van de gegevens, zelfs na nader onderzoek, niet kunnen worden geconcludeerd dat de resultaten positief of negatief zijn, en zullen ze daarom als moeilijk te interpreteren worden beschouwd.

44. De gebruikte statistische toetsen moeten het mannetje als de proefeenheid beschouwen. Hoewel het mogelijk is dat de tellingsgegevens (bv. het aantal implantaten per vrouwtje) een Poisson-verdeling volgen en/of percentages (bv. het percentage dode implantaten) binomiaal verdeeld zijn, komt het vaak voor dat dergelijke gegevens overdispersie vertonen (31). Bij de statistische analyse moet dan ook eerst getoetst worden op over- en

onderdispersie aan de hand van variantietests zoals de binomiale variantietoets van Cochran (32) of de C(α)-toets van Tarone op binomiale overdispersie (31) (33). Als er geen afwijking van de binomiale dispersie wordt gevonden, kunnen de trends in de verhoudingen in de verschillende dosisniveaus worden getoetst aan de hand van de trendtoets van Cochran-Armitage (34) en kunnen paarsgewijze vergelijkingen met de controlegroep worden getoetst aan de hand van de exacte toets van Fisher (35). Als er geen afwijking van de Poisson-dispersie wordt gevonden, kunnen de trends in tellingen worden getoetst aan de hand van Poisson-regressie (36) en kunnen paarsgewijze vergelijkingen met de controlegroep worden getoetst in het kader van het Poisson-model, aan de hand van paarsgewijze contrasten (36). Als er significante over- of onderdispersie wordt gevonden, worden non-parametrische methoden aanbevolen (23) (31). Dit zijn onder meer op rangorde gebaseerde toetsen, zoals de Jonckheere-Terpstra-trendtoets (37) en Mann-Whitney-toetsen (38) op paarsgewijze vergelijkingen met de vehiculum-/oplosmiddelcontrolegroep, evenals permutatie-, hertrekkings- of bootstraptoetsen op trend en paarsgewijze vergelijkingen met de controlegroep (31) (39).

45. Een positieve DL-bepaling levert bewijs voor de genotoxiciteit van de teststof in de kiemcellen van de behandelde mannetjes van de testsoort.

46. Bij beoordeling van de biologische significantie van de respons kan het vaststellen of de waargenomen waarden binnen of buiten het historische controlebereik vallen een aanwijzing vormen (40).

Testverslag

47. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Samenvatting

Teststof:

- bron, partijnummer, uiterste gebruiksdatum, indien beschikbaar;
- stabiliteit van de teststof, indien bekend;
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel, indien bekend;
- meting van pH, osmolaliteit en neerslag in het kweekmedium waaraan de teststof werd toegevoegd, indien van toepassing.

Stof die uit één component bestaat:

- fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water en aanvullende relevante fysisch-chemische eigenschappen;

- chemische identificatiegegevens, zoals IUPAC- of CAS-naam, CAS-nummer, SMILES- of InChI-code, structuurformule, zuiverheid, chemische identiteit van onzuiverheden, indien van toepassing en praktisch haalbaar enz.

Stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB's en mengsels:

- voor zover mogelijk, karakterisering aan de hand van chemische identiteit (zie hierboven), kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen van de bestanddelen.

Teststofbereiding:

- een motivering voor de keuze van het vehiculum;
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/vehiculum, indien bekend;
- bereiding van toedieningsvormen voor voer, drinkwater of inhalatie;
- analytische bepalingen op toedieningsvormen (zoals stabiliteit, homogeniteit, nominale concentraties), indien deze zijn uitgevoerd.

Proefdieren:

- gebruikte diersoort/stam en motivering van de keuze;
- aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;
- herkomst, leefomstandigheden, voeding enz.;
- methode om de dieren uniek te identificeren;
- voor kortetermijnonderzoeken: lichaamsgewicht van de mannetjes aan het begin en aan het eind van de test; voor onderzoeken die langer duren dan één week: individuele lichaamsgewichten gedurende het onderzoek en voedselconsumptie. Het bereik, het gemiddelde en de standaardafwijking van het lichaamsgewicht voor elke groep moet worden opgenomen.

Testomstandigheden:

- gegevens over positieve en negatieve (oplosmiddel/vehiculum) controles;
- gegevens uit het bereikbepalingsonderzoek;
- achtergrond voor de keuze van de dosisniveaus;
- gedetailleerde gegevens over de bereiding van de teststof;
- gedetailleerde gegevens over de toediening van de teststof;
- achtergrond voor de keuze van de toedieningsweg;

- methoden voor meting van diertoxiciteit, waaronder, indien beschikbaar, histopathologische of hematologische analyses en frequentie waarmee het dier is geobserveerd en het lichaamsgewicht is gemeten;
- methoden om te verifiëren of de teststof het doelweefsel heeft bereikt, of de algemene circulatie, als negatieve resultaten verkregen zijn;
- feitelijke dosis (mg/kg lichaamsgewicht/dag) berekend op basis van de teststofconcentratie in voer/drinkwater (ppm) en voedselverbruik, indien van toepassing;
- gedetailleerde gegevens over de kwaliteit van het voer en het water;
- gedetailleerde gegevens over de milieuverrijking;
- gedetailleerde omschrijving van behandeling en bemonsteringsschema's en motivering van de keuzes;
- methode van analgesie;
- wijze van doden;
- procedures voor het isoleren en preserveren van weefsels;
- bron en partijnummers van alle kits en reagentia (waar van toepassing);
- methoden voor de telling van DL's;
- paringsschema;
- gebruikte methoden om te bepalen dat de paring heeft plaatsgevonden;
- moment van doden;
- scoringscriteria voor DL-effecten, waaronder corpora lutea, implantaties, resorpties en verliezen voor implantaties, levende implantaten, dode implantaten.

Resultaten:

- conditie van het dier voor en tijdens de testperiode, inclusief tekenen van toxiciteit;
- lichaamsgewicht van mannetjes tijdens de behandelings- en paringsperioden;
- aantal gedekte vrouwtjes;
- indien mogelijk het verband tussen dosis en respons;
- gelijktijdige en historische negatieve controlegegevens met bereiken, gemiddelden en standaarddeviaties;
- gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde positieve controles;
- gegevens in tabel voor elk moederdier waaronder: aantal corpora lutea per moederdier; aantal implantaties per moederdier; aantal resorpties en verliezen vóór implantatie per

moederdier; aantal levende implantaten per moederdier; aantal dode implantaten per moederdier; foetusgewichten;

- de bovengenoemde gegevens samengevat voor elke paringsperiode en dosis, met DL-frequenties;
- gebruikte statistische analyses en methoden.

Bespreking van de resultaten.

Conclusie.

LITERATUUR

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

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

(3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J. , Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., and Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group "Dominant lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol., 39*, 173-185

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(19) Holstrom L.M., Palmer A.K. and Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In Supplementary Mutagenicity Tests. Kirkland D.J. and Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 129-156.

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

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

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

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

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

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

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

(27) OESO (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.19.), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

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

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

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

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

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

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

(34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. In *Encyclopedia of* Statistical Sciences, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Eds.), pp. 334-336. John Wiley and Sons, New York.

(35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).

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

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

(38) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York

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

(40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Chemische stof: een stof of mengsel.

Corpus luteum (corpora lutea): de hormoonafscheidende structuur die wordt gevormd in de eierstok op de plaats van een follikel na de eisprong. Het aantal corpora lutea in de eileiders komt overeen met het aantal eicellen dat is vrijgekomen.

Dominante Letale (DL) mutatie: een mutatie die optreedt in een kiemcel of die na de bevruchting gefixeerd wordt en die de dood van het embryo of van de foetus veroorzaakt.

Paringsinterval: de tijd tussen het einde van de blootstelling en de paring van de behandelde mannetjes. Door de controle van dit interval kunnen de chemische effecten op verschillende kiemceltypen worden beoordeeld. Bij muizen worden bij paring in de weken 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 en 8 na het einde van de blootstelling de effecten gemeten op sperma, gecondenseerde spermatiden, ronde spermatiden, pachytene spermatocyten, vroege spermatocyten, gedifferentieerde spermatogonia, differentiërende spermatogonia en spermatogoniale stamcellen.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

UVCB: chemische stof waarvan de samenstelling niet bekend of variabel is, complexe reactieproducten of biologische materialen.

Verlies vóór implantatie: het verschil tussen het aantal implantaten en het aantal corpora lutea. Het kan ook worden geschat door het totale aantal implantaten per vrouwtje in de behandelde en controlegroepen te vergelijken.

Verlies na implantatie: de verhouding tussen het aantal dode implantaten en het totale aantal implantaten in de behandelde groep vergeleken met dezelfde verhouding bij de controlegroep.

Vruchtbaarheidscijfer: het aantal gedekte drachtige vrouwtjes gedeeld door het aantal gedekte vrouwtjes.

Aanhangsel 2

TIJDSCHEMA VAN DE SPERMATOGENESE BIJ ZOOGDIEREN

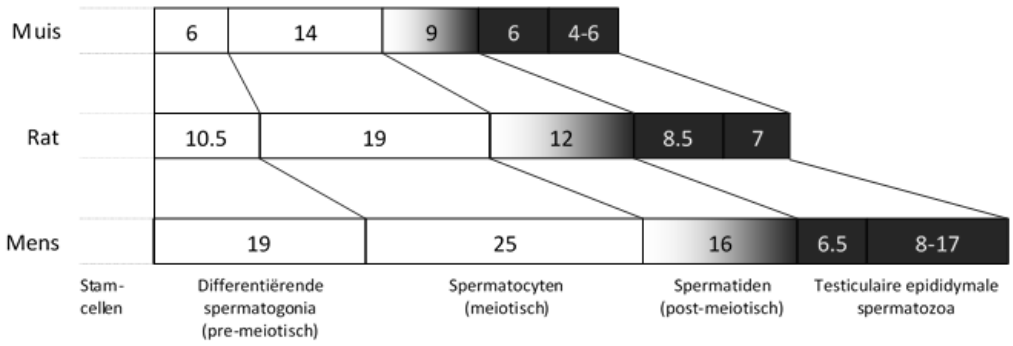


Fig. 1: Vergelijking van de duur (dagen) van de ontwikkeling van mannelijke kiemcellen bij muizen, ratten en mensen. In de gearceerde perioden treedt geen DNA-herstel op.

Hierboven is een schema weergegeven van de spermatogenese bij muizen, ratten en mensen (overgenomen uit Adler, 1996). Onder ongedifferentieerde spermatogonia vallen: A-single; A-paired; en A-aligned spermatogonia (Hess en de Franca, 2008). A-single spermatogonia worden als de echte stamcellen beschouwd; om de effecten op stamcellen te kunnen beoordelen moeten er (bij muizen) dus ten minste 49 dagen verstrijken tussen de laatste injectie van de teststof en de paring.

Referenties

Adler, ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. Mutat Res, 352:169-172.

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

4) In deel B wordt hoofdstuk B.23 vervangen door:

"B.23 TEST OP CHROMOSOOMAFWIJKINGEN IN SPERMATOGONIA VAN ZOOGDIEREN

INLEIDING

1. Deze testmethode (TM) is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 483 (2016) van de OESO. Testmethoden worden periodiek herzien in het licht van de wetenschappelijke vooruitgang, veranderende regelgevingsbehoeften en overwegingen met het oog op dierenwelzijn. In deze gewijzigde versie van de testmethode is vele jaren ervaring met deze bepaling verwerkt, alsook het potentieel om deze test te integreren in of te combineren met andere onderzoeken naar toxiciteit of genotoxiciteit. Door toxiciteitsonderzoeken te combineren hoeven mogelijk minder dieren in toxiciteitstests te worden gebruikt. Deze testmethode maakt deel uit van een reeks methoden om de genotoxiciteit te testen. De OESO heeft een document opgesteld met beknopte informatie over genetisch-toxicologische tests en een overzicht van de recente wijzigingen van de OESO-testrichtlijnen voor genetische toxiciteit (1).

2. De in-vivotest op chromosoomafwijkingen in spermatogonia van zoogdieren wordt gebruikt om te bepalen welke chemische stoffen structurele chromosoomafwijkingen in spermatogonia van zoogdieren veroorzaken (2) (3) (4). Bovendien is deze test van belang voor de beoordeling van genotoxiciteit, omdat factoren van het in-vivometabolisme, de farmacokinetiek en de DNA-herstelprocessen actief zijn en bijdragen aan de reactie op de test, hoewel deze aspecten per soort kunnen verschillen. Deze testmethode is niet bedoeld om numerieke afwijkingen te meten; de bepaling wordt meestal niet voor dat doel gebruikt.

3. Bij deze test worden structurele chromosoomafwijkingen (zowel van het chromosoomtype als het chromatidetype) in delende spermatogonia gemeten en op grond van het resultaat zullen wellicht voorspellingen kunnen worden gedaan over de inductie van erfelijke mutaties in deze kiemcellen.

4. De definities van kernbegrippen worden uiteengezet in het aanhangsel.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

5. Gewoonlijk worden in deze test knaagdieren gebruikt, maar andere soorten kunnen in sommige gevallen geschikt zijn, indien dat wetenschappelijk gerechtvaardigd is. In standaard cytogenische preparaten van knaagdiertestes worden mitotische (spermatogonia) en meiotische (spermatocyten) metafasen gegenereerd. Mitotische en meiotische metafasen zijn te herkennen aan de morfologie van de chromosomen (4). In deze in-vivo cytogenetische test worden structurele chromosoomafwijkingen gedetecteerd die zich voordoen bij de mitose van spermatogonia. Deze testmethode is niet geschikt voor andere doelweefsels.

6. Om afwijkingen van het chromatidetype in spermatogonia te detecteren, wordt de eerste mitose na de behandeling onderzocht, voordat deze afwijkingen bij latere celdelingen worden omgezet in afwijkingen van het chromosoomtype. Aanvullende informatie van behandelde spermatocyten kan worden verkregen door de chromosomen bij de meiose te analyseren op structurele afwijkingen van het chromosoomtype tijdens de diakinese-metafase I en -metafase II.

7. De testis bevat een aantal generaties spermatogonia (5) en deze verschillende kiemceltypen kunnen een uiteenlopende gevoeligheid hebben voor chemische stoffen. De geconstateerde afwijkingen vertegenwoordigen dan ook een gecombineerde respons van de behandelde spermatogoniacelpopulaties. De meerderheid van de mitotische cellen in testispreparaten zijn B-spermatogonia, die een celcyclus hebben van ongeveer 26 uur (3).

8. Als er aanwijzingen zijn dat de teststof, of een of meer metabolieten daarvan, niet in de testis terechtkomt, is deze test niet geschikt.

PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

9. In het algemeen worden de dieren 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.

VERIFICATIE VAN DE BEKWAAMHEID VAN LABORATORIA

10. Laboratoria tonen aan bekwaam te zijn in deze bepaling als zij bewijzen in staat te zijn verwachte resultaten te reproduceren voor frequenties van structurele chromosoomafwijkingen in spermatogonia met positieve controlestoffen (waaronder zwakke responsen) zoals de stoffen vermeld in tabel 1 en negatieve controlefrequenties te verkrijgen die consistent zijn met het aanvaardbare bereik voor controlegegevens in de gepubliceerde literatuur (bv. (2) (3) (6) (7) (8) (9) (10)) of met de historische controleverdeling van het laboratorium, indien beschikbaar.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Voorbereidingen

Keuze van de diersoort

11. Er moet gebruikgemaakt worden van gezonde jonge volwassen dieren van in het laboratorium gangbare stammen. Meestal worden mannetjesmuizen gebruikt, maar mannetjes van andere geschikte zoogdiersoorten kunnen ook worden gebruikt indien dit wetenschappelijk gerechtvaardigd is en de test daarmee in combinatie met een andere testmethode kan worden

uitgevoerd. De wetenschappelijke rechtvaardiging voor het gebruik van andere soorten dan knaagdieren moet in het verslag worden opgenomen.

Huisvestings- en voedingsomstandigheden van de dieren

12. De temperatuur in de proefdierruimte moet voor knaagdieren 22 °C (± 3 °C) zijn. Hoewel de relatieve vochtigheid idealiter 50-60 % is, moet deze minimaal 40 % en bij voorkeur niet hoger dan 70 % zijn, behalve bij het reinigen van de ruimte. Verlichting gebeurt met kunstlicht met een ritme van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater. De keuze van het voer kan worden beïnvloed door de noodzaak om voor een afdoende mengbaarheid met de teststof te zorgen, wanneer de stof via het voer wordt toegediend. Knaagdieren moeten worden gehuisvest in kleine groepen (niet meer dan vijf dieren per kooi) als geen agressief gedrag wordt verwacht, bij voorkeur in kooien met een stevige vloer met passende milieuverrijking. De dieren kunnen individueel worden gehuisvest als dat wetenschappelijk gerechtvaardigd is.

Voorbereiding van de dieren

13. Doorgaans worden gezonde jonge volwassen mannetjes (8-12 weken oud bij aanvang van de behandeling) gebruikt en deze worden willekeurig toegewezen aan de controlegroep en de behandelgroep. De afzonderlijke dieren krijgen op humane, minimaal invasieve wijze een unieke identificatie (bv. door het aanbrengen van een ring, tag, microchip of door biometrische identificatie, maar niet door het afknippen van oren of tenen) en krijgen minimaal vijf dagen de tijd om in het laboratorium te acclimatiseren. De kooien worden zodanig geplaatst dat mogelijke effecten door de plaatsing van de kooi tot een minimum worden beperkt. Kruisverontreiniging door de positieve controle en de teststof moet worden vermeden. Bij aanvang van het onderzoek moet het gewichtsverschil tussen de dieren zo klein mogelijk zijn en mag dit niet meer dan ± 20 % bedragen.

Voorbereiding van de doses

14. Vaste chemische teststoffen moeten worden opgelost of gesuspendeerd in geschikte oplosmiddelen of vehicula of worden vermengd met voedsel of drinkwater voordat dit aan de dieren wordt gegeven. Vloeibare chemische teststoffen kunnen direct worden gegeven of eerst worden verdund. Voor blootstelling via inhalatie kunnen teststoffen worden toegediend als gas, damp of een vaste/vloeibare aerosol, naargelang van de fysisch-chemische eigenschappen ervan. Er dienen verse preparaten van de teststof te worden toegepast, tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat bewaren van de preparaten aanvaardbaar is en blijkt wat de juiste bewaaromstandigheden zijn.

Testomstandigheden – Oplosmiddel/vehiculum

15. Het oplosmiddel/vehiculum mag bij de gebruikte dosisniveaus geen toxische effecten veroorzaken en chemische reacties met de teststoffen moeten uitgesloten zijn. Als andere oplosmiddelen/vehicula worden gebruikt dan de algemeen bekende, moet het gebruik ervan worden ondersteund met referentiegegevens die wijzen op de verenigbaarheid ervan.

Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/vehiculum kan worden gebruikt. Voorbeelden van vaak gebruikte compatibele oplosmiddelen/vehicula zijn water, fysiologische zoutoplossing, methylcelluloseoplossing, natriumcarboxymethylcellulose-zoutoplossing, olijfolie en maïsolie. Bij het ontbreken van historische of gepubliceerde controlegegevens waaruit blijkt dat een gekozen atypisch oplosmiddel/vehiculum geen structurele chromosoomafwijkingen en andere schadelijke effecten veroorzaakt, moet een eerste onderzoek worden uitgevoerd om vast te stellen dat de oplosmiddel-/vehiculumcontrole aanvaardbaar is.

Positieve controles

16. Er moeten altijd tegelijkertijd positievecontroledieren worden gebruikt, tenzij het laboratorium aantoonbare bekwaamheid heeft in het uitvoeren van de test en de test in het recente verleden (bv. de afgelopen 5 jaar) routinematig heeft uitgevoerd. Wanneer geen gelijktijdige positievecontrolegroep wordt opgenomen, moeten in elk experiment scoringcontroles (ongekleurde en ongefixeerde preparaten) worden opgenomen. Deze kunnen worden verkregen door in de scoring van het onderzoek passende referentiemonsters op te nemen die zijn verkregen en bewaard van een apart positievecontrole-experiment dat op gezette tijden (bv. elke 6-18 maanden) wordt verricht in het laboratorium waar de test wordt uitgevoerd; bijvoorbeeld tijdens de bekwaamheidstoetsing en daarna op gezette tijden, indien nodig.

17. Positieve controlestoffen moeten op betrouwbare wijze leiden tot een detecteerbare stijging in de frequenties van cellen met structurele chromosoomafwijkingen ten opzichte van de spontane niveaus. De doseringen van de positieve controles moeten zodanig worden gekozen dat de effecten duidelijk zijn, maar de gecodeerde monsters niet onmiddellijk als zodanig herkenbaar zijn voor de scorer. Voorbeelden van voor positieve controle gebruikte stoffen staan vermeld in tabel 1.

Tabel 1: Voorbeelden van positieve controlestoffen.

Stoffen [CAS-nr.] (referentienr.)
Cyclofosfamide (monohydraat) [CAS-nr. 50-18-0 (CAS-nr. 6055-19-2)] (9)
Cyclohexylamine [CAS-nr. 108-91-8] (7)
Mitomycine C [CAS-nr. 50-07-7] (6)
Acrylamide-monomeer [CAS-nr. 79-06-1] (10)
Triëthyleenmelamine [CAS-nr. 51-18-3] (8)

Negatieve controles

18. Voor elk monsternamepunt moeten er dieren voor negatieve controle worden meegenomen die zijn behandeld met alleen oplosmiddel of vehiculum en verder op dezelfde wijze als de behandelgroepen. Bij het ontbreken van historische of gepubliceerde controlegegevens waaruit

blijkt dat het gekozen oplosmiddel/vehiculum geen chromosoomafwijkingen of andere schadelijke effecten induceert, moeten er voor elk monsternamepunt ook onbehandelde controledieren worden meegenomen om vast te stellen dat de vehiculumcontrole aanvaardbaar is.

PROCEDURE

Aantal dieren

19. De vaststelling van de groepsgrootte aan het begin van het onderzoek moet erop gericht zijn minimaal 5 mannetjes per groep te krijgen. Dit aantal dieren per groep wordt voldoende geacht voor het benodigde statistisch onderscheidingsvermogen (d.w.z. om ten minste een verdubbeling van de frequentie van chromosoomafwijkingen te kunnen detecteren wanneer het negatieve controlepercentage 1,0 % of hoger is met 80 % waarschijnlijkheid bij een significantieniveau van 0,05) (3) (11). Als richtsnoer voor de typische maximale behoefte aan dieren: voor een onderzoek op twee monsternamepunten met drie dosisgroepen en een parallelle negatieve controlegroep, plus een positieve controlegroep (elk bestaande uit vijf dieren per groep) zijn 45 dieren nodig.

Behandelingsschema

20. De teststoffen worden in het algemeen eenmaal toegediend (d.w.z. in één behandeling). Andere doseringsschema's mogen worden gebruikt voor zover zij wetenschappelijk gerechtvaardigd zijn.

21. In de hoogste doseringsgroep worden twee monsternamepunten na de behandeling gebruikt. Aangezien de voor de opname en het metabolisme van de teststof(fen) vereiste tijd en de effecten op de kinetiek van de celcyclus gevolgen kunnen hebben voor het optimale tijdstip om chromosoomafwijkingen te detecteren, wordt er één vroeg en één laat monsternamepunt gebruikt rond 24 en 48 uur na de behandeling. Voor andere doses dan de hoogste dosis moet een monsternamepunt op 24 uur (minder dan of gelijk aan de lengte van de celcyclus van B-spermatogonia, zodat de waarschijnlijkheid om eerste metafasen na de behandeling te scoren zo groot mogelijk is) na de behandeling worden gekozen, tenzij bekend is dat een ander monsternamepunt geschikter en gerechtvaardigd is.

22. Er kunnen ook andere monsternamepunten worden gebruikt. Zo zijn voor chemische stoffen die S-onafhankelijke effecten hebben, mogelijk vroegere monsternamepunten (d.w.z. minder dan 24 uur na de behandeling) aangewezen.

23. Er kan een behandelingsschema met herhaalde toediening worden gebruikt, bv. in combinatie met een test voor een ander eindpunt waarbij een toedieningsperiode van 28 dagen wordt gebruikt (zoals TM B.58); er zijn dan echter wel extra groepen dieren nodig om de verschillende monsternamepunten te kunnen inpassen. Er moet dan ook per geval wetenschappelijk gerechtvaardigd worden dat een dergelijk schema geschikt is.

24. Voordat de dieren worden gedood, worden ze intraperitoneaal geïnjecteerd met een adequate dosis metafasestopper (bv. Colcemid® of colchicine). De dieren worden na een adequate wachttijd bemonsterd. Voor muizen en ratten is deze wachttijd ongeveer 3 tot 5 uur.

Dosisniveaus

25. Als er een voorbereidend bereikbepalingsonderzoek wordt uitgevoerd omdat er nog geen bruikbare gegevens over de dosering beschikbaar zijn, moet dit in hetzelfde laboratorium gebeuren met dezelfde soort, dezelfde stam en hetzelfde behandelingsschema als bij het hoofdonderzoek en volgens de aanbevelingen voor het uitvoeren van bereikbepalingsonderzoek (12). Dit onderzoek moet erop gericht zijn de maximaal verdraagbare dosis (maximum tolerated dose, MTD) vast te stellen, dat wil zeggen, de dosis die lichte toxische effecten induceert, in verhouding tot de duur van de onderzoeksperiode (bv. afwijkend gedrag of afwijkende reacties, licht gewichtsverlies of cytotoxiciteit voor het hematopoïetisch systeem), maar geen dood of aanwijzingen voor pijn, lijden of nood die humane doding van de dieren noodzakelijk maken (13).

26. 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 %.

27. Teststoffen met specifieke biologische activiteit bij lage niet-toxische doses (zoals hormonen en mitogenen) en chemische stoffen die verzadiging van toxicokinetische eigenschappen vertonen kunnen uitzonderingen zijn op de doseringscriteria en moeten per geval worden beoordeeld.

28. Om dosisresponsinformatie te krijgen, moet een volledig onderzoek een negatieve controlegroep (punt 18) omvatten en minimaal drie dosisniveaus die in het algemeen een factor 2, maar niet meer dan een factor 4, uit elkaar liggen. Als in een bereikbepalingsonderzoek of op basis van bestaande gegevens geen aanwijzingen voor toxiciteit van de teststof worden gevonden, moet de hoogste dosis voor een enkele toediening 2000 mg/kg lichaamsgewicht zijn. Als de teststof echter wel toxiciteit veroorzaakt, moet de MTD de hoogste toegediende dosis zijn en moeten de gebruikte dosisniveaus bij voorkeur een bereik dekken van maximale tot weinig of geen toxiciteit. Wanneer toxiciteit voor het doelweefsel (d.w.z. testis) bij alle geteste dosisniveaus wordt waargenomen, wordt verder onderzoek bij niet-toxische doses aanbevolen. Voor onderzoek dat ten doel heeft de kwantitatieve dosisresponsinformatie volledig te kenschetsen, kunnen aanvullende dosisgroepen nodig zijn. Voor bepaalde typen teststoffen (bv. geneesmiddelen voor menselijk gebruik) waarvoor specifieke eisen gelden, kunnen deze limieten verschillen. Als de teststof wel toxiciteit veroorzaakt, moet gekozen worden voor de limietdosis plus twee lagere doses (zoals hierboven beschreven). De limietdosis voor een toedieningsperiode van 14 dagen of meer is 1000 mg/kg lichaamsgewicht/dag en voor toedieningsperioden van minder dan 14 dagen 2000 mg/kg lichaamsgewicht/dag.

Toediening van de doses

29. Bij de opzet van een bepaling moet rekening worden gehouden met de verwachte blootstellingsroute bij mensen. Daarom kunnen andere blootstellingsroutes zoals voeding, drinkwater, lokaal, subcutaan, intraveneus, oraal (via sonde), inhalatie of implantatie worden gekozen, als deze onderbouwd worden. De route moet in elk geval zodanig worden gekozen dat adequate blootstelling van het doelweefsel is gewaarborgd. Intraperitoneale injectie wordt normaal gesproken niet aanbevolen tenzij wetenschappelijk gerechtvaardigd, omdat deze bij mensen doorgaans geen fysiologisch relevante blootstellingsroute is. Als de teststof wordt vermengd met voedsel of drinkwater, met name in geval van één toediening, moet ervoor worden gezorgd dat de tijdsduur tussen de consumptie van voedsel en water en de bemonstering voldoende is om de effecten te kunnen detecteren (zie punt 33). Het maximale vloeistofvolume dat via sonde of injectie per keer kan worden toegediend, hangt af van de grootte van het proefdier. Het volume mag normaal gesproken niet groter zijn dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht. Bij een waterige oplossing kan echter maximaal 2 ml/100 g lichaamsgewicht worden gebruikt. Hogere volumes dan dit (mits toegestaan volgens wetgeving inzake dierenwelzijn) moeten worden onderbouwd. Variaties in het testvolume moeten geminimaliseerd worden door het aanpassen van de concentratie zodat op alle dosisniveaus hetzelfde constante volume in verhouding tot het lichaamsgewicht kan worden gebruikt.

Waarnemingen

30. Algemene klinische waarnemingen van de proefdieren moeten ten minste eenmaal per dag plaatsvinden en klinische tekenen moeten ten minste eenmaal per dag worden geregistreerd, bij voorkeur steeds op hetzelfde tijdstip en met inachtneming van de piekperiode van de te verwachten effecten na toediening. Alle dieren moeten ten minste tweemaal per dag worden geobserveerd op ziekteverschijnselen en sterfte. Alle dieren moeten bij aanvang van het onderzoek, tijdens onderzoeken met herhaalde toediening ten minste eenmaal per week, en bij het doden worden gewogen. In onderzoeken met een duur van ten minste één week moet het voedselverbruik ten minste wekelijks worden gemeten. Als de teststof met het drinkwater wordt toegediend, moet het waterverbruik bij elke verversing van water en ten minste wekelijks worden gemeten. Dieren die niet-letale indicatoren van excessieve toxiciteit vertonen moeten voor afloop van de testperiode worden gedood (13).

Chromosoompreparaten

31. Onmiddellijk nadat het dier is gedood worden suspensies gemaakt van kiemcellen uit één testis of beide testes en worden deze in een hypotone oplossing gebracht en volgens vastgestelde protocollen gefixeerd (bv. (2) (14) (15)). De cellen worden vervolgens op objectglaasjes uitgesmeerd en gekleurd (16) (17). Alle objectglaasjes moeten worden gecodeerd zodat de identiteit ervan onbekend blijft voor de scorer.

Analyse

32. Voor elk dier moeten er ten minste 200 goed gespreide metafasen worden gescoord (3) (11). Als de historische negatieve controlefrequentie < 1 % is, moeten er meer dan 200 cellen/dier worden gescoord om het statistisch onderscheidingsvermogen te vergroten (3). Er moeten kleuringsmethoden worden gebruikt waarmee het centromeer herkenbaar is.

33. Afwijkingen in het chromosoomtype en het chromatidetype moeten afzonderlijk worden opgetekend en ingedeeld in subtypen (breuken, uitwisselingen). Hiaten moeten worden geregistreerd maar niet in aanmerking genomen wanneer wordt bepaald of een chemische stof de incidentie van cellen met chromosoomafwijkingen significant verhoogt. De in het laboratorium gebruikte procedures moeten ervoor zorgen dat de analyse van chromosoomafwijkingen wordt uitgevoerd door goed opgeleide scorers. Aangezien bij de bereiding van de objectglaasjes vaak een gedeelte van de metafasecellen breekt, waarbij chromosomen verloren gaan, mogen de gescoorde cellen niet minder dan $2n \pm 2$ centromeren bevatten, waarin n het haploïde aantal chromosomen voor die soort is.

34. Hoewel de test bedoeld is om structurele chromosoomafwijkingen op te sporen, is het belangrijk dat de frequenties van polyploïde cellen en cellen met endoreduplicatie van chromosomen worden opgetekend wanneer deze gebeurtenissen worden waargenomen (zie punt 44).

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verwerking van de resultaten

35. Gegevens van individuele dieren moeten in tabelvorm worden gepresenteerd. Voor elk dier moet het aantal cellen met een of meer structurele chromosoomafwijkingen en het aantal chromosoomafwijkingen per cel worden bepaald. Er moet een uitgesplitst overzicht worden gegeven van de afwijkingen in het chromatidetype en chromosoomtype ingedeeld in subtypen (breuken, uitwisselingen), met de aantallen en de frequentie waarmee ze in de behandelde en controlegroepen voorkomen. Hiaten worden afzonderlijk geregistreerd. De frequentie van hiaten wordt in het verslag vermeld, maar in het algemeen niet opgenomen in de analyse van de totale frequentie van structurele chromosoomafwijkingen. Het percentage polyploïde cellen en cellen met endoreduplicatie van chromosomen wordt gerapporteerd wanneer dergelijke cellen worden waargenomen.

36. Gegevens over toxiciteit en klinische tekenen moeten volgens punt 30 worden gemeld.

Aanvaardbaarheidscriteria

37. Voor de aanvaardbaarheid van een test gelden de volgende criteria:

- de gelijktijdige negatieve controle komt overeen met de gepubliceerde normen voor historische negatieve controlegegevens, waarbij in het algemeen een percentage > 0 % en ≤ 1,5 % cellen met chromosoomafwijkingen wordt verwacht, en de historische controlegegevens van het laboratorium indien beschikbaar (zie punten 10 en 18);

- de gelijktijdige positieve controles induceren responsen die overeenkomen met de gepubliceerde normen voor historische positieve controlegegevens en de databank met historische positieve controlegegevens van het laboratorium indien beschikbaar, en leiden tot een statistisch significante toename vergeleken met de negatieve controle (zie punten 17 en 18);
- er zijn voldoende aantallen cellen en doses geanalyseerd (zie punten 28 en 32);
- de criteria voor de selectie van de hoogste dosis zijn consistent met de criteria beschreven in de punten 25 en 26.

38. Als zowel mitose als meiose worden 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. Als alleen de mitose wordt geobserveerd, moet in ten minste 1 000 cellen voor elk dier de mitotische index worden bepaald.

Beoordeling en interpretatie van resultaten

39. Minstens drie behandelde dosisgroepen moeten worden geanalyseerd om voldoende gegevens voor een dosisresponsanalyse te verkrijgen.

40. Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt een teststof als duidelijk positief beschouwd als:

- minstens één van de testdoses een statistisch significante toename vertoont vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle;
- de stijging dosisgerelateerd is op ten minste één monsternamepunt; en
- een of meer van de resultaten buiten het aanvaardbare gegevensbereik voor de negatieve controle vallen, of buiten de verdeling van de historische negatieve controlegegevens van het laboratorium (bv. op Poisson-verdeling gebaseerde 95 %-controlegrens), indien beschikbaar.

De teststof wordt dan in staat geacht om chromosoomafwijkingen te induceren in de spermatogoniale cellen van de proefdieren. In de literatuur zijn eveneens aanbevelingen te vinden voor de meest geschikte statistische methoden (11) (18). De gebruikte statistische toetsen moeten het dier als de proefeenheid beschouwen.

41. Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt een teststof als duidelijk negatief beschouwd als:

- geen van de testdoses een statistisch significante toename vertoont vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle;
- er in geen enkele experimentele omstandigheid een toename gevonden wordt die verband houdt met de dosis; en

- alle resultaten binnen het aanvaardbare gegevensbereik voor de negatieve controle vallen, of binnen de historische negatieve controlegegevens van het laboratorium (bv. op Poisson-verdeling gebaseerde 95 %-controlegrens), indien beschikbaar.

De teststof wordt dan niet in staat geacht om chromosoomafwijkingen te induceren in de spermatogoniale cellen van de proefdieren. In de literatuur zijn eveneens aanbevelingen te vinden voor de meest geschikte statistische methoden (11) (18). Een negatief resultaat sluit de mogelijkheid niet uit dat de chemische stof in latere, niet onderzochte ontwikkelingsfasen chromosoomafwijkingen veroorzaakt, of genmutaties.

42. Een duidelijk positieve of duidelijk negatieve reactie behoeft niet te worden bevestigd.

43. Indien de reactie noch duidelijk negatief noch duidelijk positief is en om de biologische relevantie van een resultaat te helpen vaststellen (bv. een zwakke of zeer lichte toename), moeten de gegevens door een deskundige en/of nader onderzoek op basis van de bestaande testgegevens worden beoordeeld, bijvoorbeeld om nader vast te stellen of het positieve resultaat buiten het aanvaardbare gegevensbereik voor de negatieve controle valt, of buiten de historische negatieve controlegegevens van het laboratorium (19).

44. In zeldzame gevallen zal op basis van de gegevens, zelfs na nader onderzoek, niet kunnen worden geconcludeerd dat de resultaten positief of negatief zijn, en zullen ze daarom als moeilijk te interpreteren worden beschouwd.

45. Een stijging van het aantal polyploïde cellen kan erop wijzen dat de teststof in staat is mitotische processen te remmen en numerieke chromosoomafwijkingen te induceren (20). Een stijging van het aantal cellen met endoreduplicatie van chromosomen kan erop duiden dat de teststof in staat is de voortgang van de celcyclus te remmen (21) (22), hetgeen een ander mechanisme is waarmee numerieke veranderingen in de chromosomen kunnen worden geïnduceerd, naast remming van de mitotische processen (zie punt 2). De incidentie van polyploïde cellen en cellen met endoreduplicatie van chromosomen moet daarom apart worden geregistreerd.

Testverslag

46. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Samenvatting

Teststof:

- bron, partijnummer, uiterste gebruiksdatum, indien beschikbaar;
- stabiliteit van de teststof, indien bekend;
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel, indien bekend;

- meting van pH, osmolaliteit en neerslag in het kweekmedium waaraan de teststof werd toegevoegd, indien van toepassing.

Stof die uit één component bestaat:

- fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water en aanvullende relevante fysisch-chemische eigenschappen;
- chemische identificatiegegevens, zoals IUPAC- of CAS-naam, CAS-nummer, SMILES- of InChI-code, structuurformule, zuiverheid, chemische identiteit van onzuiverheden, indien van toepassing en praktisch haalbaar enz.

Stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB's en mengsels:

- voor zover mogelijk, karakterisering aan de hand van chemische identiteit (zie hierboven), kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen van de bestanddelen.

Teststofbereiding:

- een motivering voor de keuze van het vehiculum;
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/vehiculum;
- bereiding van toedieningsvormen voor voer, drinkwater of inhalatie;
- analytische bepalingen op toedieningsvormen (zoals stabiliteit, homogeniteit, nominale concentraties);
- indien deze zijn uitgevoerd.

Proefdieren:

- gebruikte diersoort/stam en motivering van het gebruik;
- aantal en leeftijd van de dieren;
- herkomst, leefomstandigheden, voeding enz.;
- methode om de dieren uniek te identificeren;
- voor kortetermijnonderzoeken: individueel gewicht van de dieren aan het begin en aan het eind van de test; voor onderzoeken die langer duren dan één week: individuele lichaamsgewichten gedurende het onderzoek en voedselconsumptie. Het bereik, het gemiddelde en de standaardafwijking van het lichaamsgewicht voor elke groep moet worden opgenomen.

Testomstandigheden:

- gegevens over positieve en negatieve (oplosmiddel/vehiculum) controles;
- gegevens uit het bereikbepalingsonderzoek, indien dit is uitgevoerd;
- achtergrond voor de keuze van de dosisniveaus;
- achtergrond voor de keuze van de toedieningsweg;

- gedetailleerde gegevens over de bereiding van de teststof;
- gedetailleerde gegevens over de toediening van de teststof;
- achtergrond voor de keuze van het tijdstip waarop de dieren gedood worden;
- methoden voor meting van diertoxiciteit, waaronder, indien beschikbaar, histopathologische of hematologische analyses en frequentie waarmee het dier is geobserveerd en het lichaamsgewicht is gemeten;
- methoden om te verifiëren of de teststof het doelweefsel heeft bereikt, of de algemene circulatie, als negatieve resultaten verkregen zijn;
- feitelijke dosis (mg/kg lichaamsgewicht/dag) berekend op basis van de teststofconcentratie in voer/drinkwater (ppm) en voedselverbruik, indien van toepassing;
- gedetailleerde gegevens over de kwaliteit van het voer en het water;
- gedetailleerde omschrijving van behandeling en bemonsteringsschema's en motivering van de keuzes;
- wijze van doden;
- wijze van pijnbestrijding (indien gebruikt);
- procedures voor het isoleren van weefsels;
- naam van de metafasestopper, gebruikte concentratie en behandelingsduur;
- 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:

- conditie van het dier voor en tijdens de testperiode, inclusief tekenen van toxiciteit;
- lichaams- en orgaangewicht bij het doden van het dier (indien meerdere behandelingen worden toegepast, lichaamsgewichten tijdens de behandeling);
- tekenen van toxiciteit;
- mitotische index;
- verhouding tussen cellen in spermatogoniamitose en eerste en tweede meiosemetafase, of ander bewijs voor blootstelling van het doelweefsel;
- 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;
- indien mogelijk het verband tussen dosis en respons;
- gebruikte statistische analyses en methoden;
- gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve controles;
- gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve controles, met vermelding van spreiding, gemiddelden en standaarddeviaties en 95 %-betrouwbaarheidsinterval (indien beschikbaar), of gepubliceerde gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve controles die zijn gebruikt voor de aanvaardbaarheid van de testresultaten;
- gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde positieve controles;
- veranderingen in de ploïdie, indien waargenomen, met inbegrip van veranderingen in de frequenties van polyploïdie en/of cellen met endoreduplicatie.

Bespreking van de resultaten

Conclusie

LITERATUUR

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(13) OESO (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, No 19), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

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

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

(16) 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, 289-294.

(17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics 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.

(18) 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.

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

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

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

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

Aanhangsel

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.

Aneuploïdie**:** elke afwijking van het normale diploïde (of haploïde) aantal chromosomen met één chromosoom of meer dan één chromosoom, maar niet met (een) volledige reeks(en) chromosomen (polyploïdie).

Centromeer: 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.

Chemische stof: een stof of mengsel.

Clastogeen**:** chemische stof die structurele chromosoomafwijkingen veroorzaakt in populaties van cellen of organismen.

Genotoxisch: een algemene term die alle typen DNA- of chromosoombeschadiging omvat, waaronder breuken, deleties, adducten, veranderingen en bindingen van nucleotiden, herschikkingen, mutaties, chromosoomafwijkingen en aneuploïdie. Niet alle soorten genotoxische effecten leiden tot mutaties of stabiele chromosoombeschadiging."

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.

Mitose: deling van de celkern die doorgaans wordt ingedeeld in profase, prometafase, metafase, anafase en telofase.

Mitotische index (MI): 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.

Mutageen: produceert een erfelijke wijziging van DNA-basepaarsequentie(s) in genen of van de structuur van chromosomen (chromosoomafwijkingen).

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

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

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

UVCB: chemische stoffen waarvan de samenstelling niet bekend of variabel is, complexe reactieproducten of biologische materialen.

Verscheidenheid van de chromosomen: verscheidenheid in de vorm (bv. metacentrisch, acrocentrisch enz.) en grootte van chromosomen.".

5) In deel B wordt hoofdstuk B.40 vervangen door:

"B.40. IN-VITROHUIDCORROSIE: TESTMETHODE OP BASIS VAN DE TRANSCUTANE ELEKTRISCHE WEERSTAND (TEW)

INLEIDING

1. Deze testmethode (TM) is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 430 (2015) van de OESO. Onder huidcorrosie wordt verstaan: het ontstaan van irreversibele schade aan de huid in de vorm van zichtbare necrose door de epidermis heen in de dermis, na het aanbrengen van een teststof (zoals gedefinieerd door het mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, GHS) van de Verenigde Naties (VN) (1) en Verordening (EU) nr. 1272/2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels (CLP-verordening)1). Deze bijgewerkte testmethode B.40 bevat een in-vitroprocedure voor het identificeren van niet-corrosieve en corrosieve stoffen en mengsels overeenkomstig het VN-GHS (1) en de CLP-verordening.

2. De bepaling van de huidcorrosiviteit ging meestal gepaard met het gebruik van proefdieren (TM B.4, gelijkwaardig aan OESO TG 404; oorspronkelijk vastgesteld in 1981, herzien in 1992, 2002, 2015) (2). Naast deze TM B.40 zijn er nog andere in-vitromethoden voor het testen van het potentieel voor huidcorrosie van chemische stoffen gevalideerd en goedgekeurd als TM B.40 bis (gelijkwaardig aan OESO TG 431) (3) en TM B.65 (gelijkwaardig aan OESO TG 435) (4), waarmee corrosieve chemische stoffen zo nodig ook in subcategorieën kunnen worden ingedeeld. Er zijn verschillende gevalideerde in-vitrotestmethoden goedgekeurd als TM B.46 (gelijkwaardig aan OESO TG 439) (5) voor het testen op huidirritatie. In een OESO-leidraad voor een geïntegreerde test- en beoordelingsbenadering (Integrated Approach on Testing and Assessment, IATA) voor huidcorrosie en -irritatie worden verschillende modules beschreven met uiteenlopende gedeelde informatiebronnen en analyse-instrumenten. De IATA i) biedt richtsnoeren voor de integratie en het gebruik van bestaande gegevens die zijn verzameld met behulp van test- en niet-testmethoden om het potentieel voor huidirritatie en -corrosie van chemische stoffen te beoordelen en ii) draagt een benadering aan voor wanneer verder testen nodig is (6).

[1] Verordening (EG) nr. 1272/2008 van het Europees Parlement en de Raad van 16 december 2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels, tot wijziging en intrekking van de Richtlijnen 67/548/EEG en 1999/45/EG en tot wijziging van Verordening (EG) nr. 1907/2006, PB L 353 van 31.12.2008, blz. 1.

3. Deze testmethode heeft betrekking op huidcorrosie als eindpunt voor de menselijke gezondheid. Ze is gebaseerd op de testmethode op basis van de transcutane elektrische weerstand (TEW) bij rattenhuid. Deze testmethode maakt gebruik van huidschijfjes om corrosieve stoffen te identificeren op basis van hun vermogen om een verlies van de normale intacte staat en barrièrefunctie van het stratum corneum te veroorzaken. De overeenkomstige testrichtlijn van de OESO werd oorspronkelijk vastgesteld in 2004 en bijgewerkt in 2015 met verwijzingen naar de IATA-leidraad.

4. Ter evaluatie van de in-vitrotests betreffende huidcorrosie met het oog op regelgeving zijn er prevalideringsstudies uitgevoerd (7), gevolgd door een formele valideringsstudie van de TEW-testmethode met rattenhuid voor de bepaling van huidcorrosie (8) (9) (10) (11). De resultaten van deze studies hebben geleid tot de aanbeveling dat de TEW-testmethode (aangeduid als de Validated Reference Method (VRM), gevalideerde referentiemethode) met het oog op regelgeving kon worden gebruikt voor de bepaling van de in-vivohuidcorrosiviteit (12) (13) (14).

5. Voordat een voorgestelde soortgelijke of gewijzigde in-vitro-TEW-testmethode voor huidcorrosie anders dan de VRM kan worden gebruikt met het oog op regelgeving, moeten de betrouwbaarheid, relevantie (nauwkeurigheid) en beperkingen ervan voor het voorgestelde gebruik bepaald worden om te waarborgen dat de methode vergelijkbaar is met de VRM, overeenkomstig de vereisten van de prestatienormen (15). De wederzijdse aanvaarding van gegevens in overeenstemming met de OESO-overeenkomst is pas gewaarborgd wanneer voorgestelde nieuwe of bijgewerkte testmethoden volgens de prestatienormen zijn geëvalueerd en zijn opgenomen in de overeenkomstige OESO-testrichtlijn.

DEFINITIES

6. Gebruikte definities worden gegeven in het aanhangsel.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

7. In een valideringsstudie (10) en andere gepubliceerde onderzoeken (16) (17) is gerapporteerd dat met de TEW-testmethode met rattenhuid een betrouwbaar onderscheid kan worden gemaakt tussen stoffen waarvan bekend is dat ze corrosief c.q. niet-corrosief voor de huid zijn, met een algemene gevoeligheid van 94 % (51/54) en een specificiteit van 71 % (48/68) voor een databank van 122 stoffen.

8. Deze testmethode heeft betrekking op in-vitrohuidcorrosie en biedt een procedure voor het identificeren van niet-corrosieve en corrosieve teststoffen overeenkomstig het VN-GHS en de CLP-verordening. Deze testmethode heeft als beperking, zoals gebleken is in de valideringsstudies (8) (9) (10) (11), dat het niet mogelijk is om een indeling van corrosieve stoffen en mengsels in subcategorieën te maken overeenkomstig het VN-GHS en de CLP-verordening. Hoe deze testmethode wordt gebruikt, wordt bepaald door het toepasselijke

regelgevingskader. Hoewel deze testmethode geen toereikende informatie over huidirritatie oplevert, moet worden opgemerkt dat TM B.46 specifiek betrekking heeft op het gezondheidseffect huidirritatie in vitro (5). Voor een volledige beoordeling van lokale huideffecten na één blootstelling op de huid moet de OESO-leidraad voor IATA worden geraadpleegd (6).

9. Bij de onderliggende validering van deze testmethode werd een groot aantal chemische producten, waarvan de meeste in de vorm van stoffen, getest en de empirische databank van de valideringsstudie bevatte 60 stoffen die een groot aantal verschillende chemische klassen vertegenwoordigden (8) (9). Op basis van de globale beschikbare gegevens is de testmethode van toepassing op een groot aantal verschillende chemische klassen en fysische toestanden, waaronder vloeistoffen, halfvaste stoffen, vaste stoffen en wassen. Omdat teststoffen met geschikte referentiegegevens voor bepaalde fysische toestanden niet gemakkelijk beschikbaar zijn, zij erop gewezen dat het aantal wassen en corrosieve vaste stoffen dat bij de validering beoordeeld werd, betrekkelijk gering was. Vloeistoffen mogen waterig of niet-waterig zijn; vaste stoffen mogen al dan niet in water oplosbaar zijn. Wanneer kan worden aangetoond dat de testmethode niet kan worden toegepast op een specifieke categorie van stoffen, mag de testmethode niet voor die specifieke categorie van stoffen worden gebruikt. Voorts wordt aangenomen dat deze testmethode, in het verlengde van de toepasbaarheid ervan op stoffen, ook op mengsels kan worden toegepast. Mengsels vertegenwoordigen evenwel een breed spectrum aan categorieën en samenstellingen en er is vooralsnog slechts beperkte informatie over het testen van mengsels beschikbaar. Wanneer kan worden aangetoond dat de testmethode niet op een specifieke categorie van mengsels kan worden toegepast (bv. aan de hand van een strategie zoals voorgesteld door Eskes *et al.*, 2012) (18), mag de testmethode dan ook niet voor die specifieke categorie van mengsels worden gebruikt. Voordat de testmethode wordt gebruikt op een mengsel om gegevens te genereren voor een beoogd regelgevingsdoel, moet worden nagegaan of, en zo ja, waarom deze methode betrouwbare resultaten oplevert voor dat doel. Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is. Gassen en aerosolen zijn nog niet gevalideerd in valideringsstudies (8) (9). Hoewel het denkbaar is dat deze met behulp van de TEW-testmethode kunnen worden getest, staat de huidige testmethode het testen van gassen en aerosolen niet toe.

PRINCIPE VAN DE TEST

10. De teststof wordt gedurende maximaal 24 uur aangebracht op het oppervlak van de epidermis van huidschijfjes in een testsysteem met twee compartimenten waarin de huidschijfjes als scheiding tussen de compartimenten fungeren. De huidschijfjes worden weggenomen uit de huid van op humane wijze gedode ratten met een leeftijd van 28-30 dagen. Corrosieve chemische stoffen wordt gekenmerkt doordat ze een verlies van de normale intacte staat en barrièrefunctie van het stratum corneum kunnen veroorzaken, dat wordt gemeten als een daling van de TEW tot onder een drempelwaarde (16) (zie punt 32). Voor de TEW bij rattenhuid is een drempelwaarde van 5 kΩ gekozen op basis van uitgebreide gegevens voor een breed scala

van stoffen, waarbij de overgrote meerderheid van de waarden duidelijk boven (vaak > 10 kΩ) of duidelijk onder (vaak < 3 kΩ) deze waarde lag (16). In het algemeen verlagen teststoffen die bij dieren niet corrosief zijn maar wel irriterend of niet-irriterend, de TEW niet tot onder de drempelwaarde. Bovendien kan het gebruik van andere huidpreparaten of andere apparatuur deze drempelwaarde veranderen, zodat een verdere validering nodig is.

11. In de testprocedure wordt een kleurstofbindende stap opgenomen als bevestigende test voor positieve resultaten bij de TEW, onder andere voor waarden rond de 5 kΩ. Met de kleurstofbindende stap wordt bepaald of de toename van de permeabiliteit voor ionen door een fysieke vernietiging van het stratum corneum wordt veroorzaakt. Er is aangetoond dat met de TEW-methode met rattenhuid een prognose kan worden gegeven voor de in-vivobepaling van de corrosiviteit bij het konijn volgens testmethode B.4 (2).

AANTONING VAN BEKWAAMHEID

12. Voordat de TEW-testmethode met rattenhuid routinematig wordt gebruikt op een manier die aansluit bij deze testmethode, moeten laboratoria hun technische bekwaamheid aantonen door een correcte indeling van de twaalf in tabel 1 aanbevolen stoffen voor bekwaamheidstoetsing. Wanneer een stof uit de lijst niet beschikbaar is of indien zulks gerechtvaardigd is, kan een andere stof waarvoor voldoende in-vivo- en in-vitroreferentiegegevens beschikbaar zijn, worden gebruikt (bv. uit de lijst met referentiestoffen (16)), mits dezelfde selectiecriteria als in tabel 1 worden toegepast.

Tabel 1: Lijst van stoffen voor bekwaamheidstoetsing[1]

Stof	CAS RN	Chemische klasse[2]	VN-GHS/CLP -cat. op basis van in-vivoresultaten[3]	VRM -cat. op basis van in-vitroresultaten	Fysische toestand	pH[4]
Stoffen die in vivo corrosief zijn						
N,*N*'-Dimethyl-dipropyleentriamine	10563-29-8	organische base	1A	6 x C	Vloeistof	8,3
1,2-Diaminopropaan	78-90-0	organische base	1A	6 x C	Vloeistof	8,3
Zwavelzuur (10 %)	7664-93-9	anorganisch zuur	(1A/)1B/1C	5 x C 1x NC	Vloeistof	1,2
Kaliumhydroxide (10 % water)	1310-58-3	anorganische base	(1A/)1B/1C	6 x C	Vloeistof	13,2
Octaanzuur (caprylzuur)	124-07-2	organisch zuur	1B/1C	4 x C 2 x NC	Vloeistof	3,6
2-*tert*-Butylfenol	88-18-6	fenol	1B/1C	4 x C 2 x NC	Vloeistof	3,9
Stoffen die in vivo niet corrosief zijn						
Isostearinezuur	2724-58-5	organisch zuur	NC	6 x NC	Vloeistof	3,6

Stof	CAS RN	Chemische klasse[2]	VN-GHS/CLP -cat. op basis van in-vivoresultaten[3]	VRM -cat. op basis van in-vitroresultaten	Fysische toestand	pH[4]
4-Amino-1,2,4-triazool	584-13-4	organische base	NC	6 x NC	Vaste stof	5,5
Fenethylbromide	103-63-9	elektrofiel	NC	6 x NC	Vloeistof	3,6
4-(Methylthio)benzaldehyd	3446-89-7	elektrofiel	NC	6 x NC	Vloeistof	6,8
1,9-Decadieen	1647-16-1	neutrale organische	NC	6 x NC	Vloeistof	3,9
Tetrachloorethyleen	127-18-4	neutrale organische	NC	6 x NC	Vloeistof	4,5

Afkortingen: aq = waterig; CAS RN = registratienummer van de Chemical Abstract Service; VRM = Validated Reference Method (gevalideerde referentiemethode); NB = niet bepaald.

[1]De stoffen voor bekwaamheidstoetsing, eerst gesorteerd op corrosief versus niet-corrosief, vervolgens op subcategorie van corrosieve stoffen en ten slotte op chemische klasse, zijn geselecteerd uit de stoffen die zijn gebruikt in de valideringsstudie voor de TEW-testmethode met rattenhuid van het Europees Centrum voor de validatie van alternatieve methoden (CEVMA) (8) (9). Tenzij anders aangegeven zijn de stoffen getest in de zuiverheidsgraad waarin ze in de handel kunnen worden gekocht (8). Voor zover mogelijk omvat de selectie stoffen die: i) het hele spectrum aan corrosieve responsen bestrijken (bv. niet-corrosieve stoffen; zwak tot sterk corrosieve stoffen) die de VRM kan meten of voorspellen; ii) representatief zijn voor de chemische klassen die in de valideringsstudie zijn gebruikt; iii) overeenkomen met de prestatiekenmerken van de VRM; iv) een goed omschreven chemische structuur hebben; v) eenduidige resultaten opleveren in de in-vivoreferentietestmethode; vi) in de handel verkrijgbaar zijn; en waaraan vii) geen buitensporige verwijderingskosten verbonden zijn.

[2]Chemische klasse toegekend door Barratt *et al.* (8).

[3]De overeenkomstige VN-verpakkingsgroepen voor de VN-GHS/CLP-categorieën 1A, 1B en 1C zijn respectievelijk I, II en III.

[4]De pH-waarden zijn ontleend aan Fentem *et al.* (9) en Barratt *et al.* (8).

PROCEDURE

13. Voor de TEW-testmethode voor huidcorrosie met rattenhuid zijn standaardwerkwijzen (Standard Operating Procedures, SOP's) beschikbaar (19). De TEW-testmethoden met rattenhuid die door deze testmethode worden bestreken, moeten aan de volgende voorwaarden voldoen:

Dieren

14. Er moeten ratten worden gebruikt, omdat de gevoeligheid van de huid van ratten voor de stoffen in deze testmethode al eerder is aangetoond (12) en dit de enige huidbron is die formeel gevalideerd is (8) (9). De leeftijd (wanneer de huid wordt weggenomen) en de stam van de rat zijn heel belangrijk om ervoor te zorgen dat de haarfollikels in de rustfase verkeren voordat de volwassen haargroei begint.

15. Het haar op de rug en de flanken van jonge (ongeveer 22 dagen oude) mannetjes- of vrouwtjesratten (Wistar of een vergelijkbare stam) wordt met een kleine schaar zorgvuldig

verwijderd. De dieren worden vervolgens gewassen door zorgvuldig te wrijven terwijl het geknipte gebied wordt ondergedompeld in een antibiotica-oplossing (die bijvoorbeeld streptomycine, penicilline, chlooramfenicol en amfotericine bevat in concentraties die werkzaam zijn voor het remmen van de groei van bacteriën). De dieren worden op de derde of vierde dag na de eerste keer wassen opnieuw met antibiotica gewassen en worden binnen 3 dagen na de tweede keer wassen, wanneer het stratum corneum zich van de verwijdering van het haar hersteld heeft, gebruikt.

Het prepareren van de huidschijfjes

16. De dieren worden op humane wijze gedood wanneer ze 28-30 dagen oud zijn; deze leeftijd is van cruciaal belang. Vervolgens wordt de huid van de rug en de flanken van elk dier verwijderd en van overtollig onderhuids vet ontdaan door het voorzichtig van de huid los te trekken. Daarna worden er huidschijfjes verwijderd met een diameter van ongeveer 20 mm per stuk. De huid mag worden bewaard voordat de schijfjes worden gebruikt, wanneer wordt aangetoond dat de gegevens van de positieve en negatieve controles gelijkwaardig zijn aan die van verse huid.

17. Elk huidschijfje wordt over een van de uiteinden 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. Vervolgens wordt de rubber "O"-ring zorgvuldig met vaseline aan de PTFE-buis vastgekit. De buis wordt met een klemring vastgezet in een receptorcompartiment dat een $MgSO_4$-oplossing (154 mM) bevat (figuur 1). Het huidschijfje moet volledig in de $MgSO_4$-oplossing worden ondergedompeld. Van één rattenhuid kunnen wel 10-15 huidschijfjes worden gemaakt. In figuur 2 worden de afmetingen van de buis en de "O"-ring aangegeven.

18. Voordat de test begint, wordt als kwaliteitsborgingsprocedure voor elke rattenhuid de TEW van twee huidschijfjes gemeten. Als bij beide schijfjes een elektrische weerstand van meer dan 10 kΩ wordt gemeten, mogen de overige schijfjes voor de testmethode worden gebruikt. Als de gemeten weerstand lager dan 10 kΩ is, mogen de overige schijfjes van die huid niet worden gebruikt.

Het aanbrengen van de teststof en de controlestoffen

19. Voor elke testrun (elk experiment) moeten parallelle positieve en negatieve controles worden gebruikt om na te gaan of het experimentele model afdoende functioneert. Voor elke testrun (elk experiment) moeten huidschijfjes van één dier worden gebruikt. Als positieve en negatieve controlestof worden respectievelijk 10 M zoutzuur en gedestilleerd water aanbevolen.

20. Vloeibare teststoffen (150 µl) worden gelijkmatig op het oppervlak van de epidermis in de buis aangebracht. Wanneer vast materiaal wordt getest, wordt een zodanige hoeveelheid van de vaste stof gelijkmatig 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

wordt de buis voorzichtig geschud. Om voor een maximaal contact met de huid te zorgen kan het nodig zijn dat vaste stoffen tot 30 °C worden verwarmd om de teststof te laten smelten of zachter te maken of worden fijngemalen om een korrelig materiaal of poeder te verkrijgen.

21. In elke testrun (elk experiment) worden voor elke test- en controlestof drie huidschijfjes gebruikt. De teststoffen worden gedurende 24 uur bij 20-23 °C aangebracht. De teststof wordt verwijderd door onder een straal leidingwater van maximaal kamertemperatuur te wassen tot er geen materiaal meer kan worden verwijderd.

TEW-metingen

22. De impedantie van de huid wordt als TEW gemeten met een wisselstroombrug van Wheatstone voor zwakstroom (18). Algemene specificaties van de brug zijn: bedrijfsspanning 1-3 Volt, een sinusvormige of rechthoekige wisselstroom van 50 tot 1 000 Hz en een meetbereik van ten minste 0,1-30 kΩ. Met de bij de valideringsstudie gebruikte meetbrug konden inductantie, capacitantie en weerstand worden gemeten tot waarden van respectievelijk 2 000 H, 2 000 μF en 2 MΩ, bij frequenties van 100 Hz of 1 kHz, met seriële of parallelle waarden. Voor de TEW-corrosiviteitsbepaling worden de metingen geregistreerd in weerstand bij een frequentie van 100 Hz en met seriële waarden. 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 uit de buis verwijderd en wordt het weefsel gehydrateerd door 3 ml $MgSO_4$-oplossing (154 mM) toe te voegen. De elektroden van de meetbrug worden aan weerszijden van het huidschijfje geplaatst om de weerstand in kΩ/huidschijfje te meten (zie figuur 1). De afmetingen van de elektrode en de lengte van het stuk elektrode dat onder de krokodillenklem uitkomt, zijn vermeld in figuur 2. De klem van de binnenste 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 $MgSO_4$-oplossing steekt. De buitenste elektrode wordt zodanig in het receptorcompartiment geplaatst dat deze op de bodem van het compartiment rust. De afstand tussen de klemring en de onderkant van de PTFE-buis wordt constant gehouden (zie figuur 2), aangezien deze afstand de gemeten weerstand beïnvloedt. Dit houdt in dat de afstand tussen de binnenste elektrode en het huidschijfje constant en minimaal moet zijn (1-2 mm).

23. Als de gemeten weerstand hoger is dan 20 kΩ, kan dit worden veroorzaakt door de resten van de teststof waarmee het oppervlak van de epidermis van het huidschijfje bedekt is. Deze laag kan men verder trachten te verwijderen door bijvoorbeeld de PTFE-buis met de duim (met handschoen) dicht te houden en gedurende ongeveer 10 seconden te schudden; de $MgSO_4$-oplossing wordt weggegooid en de weerstandsmeting wordt met een verse $MgSO_4$-oplossing herhaald.

24. De eigenschappen en afmetingen van de gebruikte testapparatuur en de testprocedure kunnen de gevonden TEW-waarden beïnvloeden. De drempelwaarde voor corrosie van 5 kΩ is bepaald op grond van gegevens die met de specifieke in deze testmethode beschreven apparatuur en

procedure zijn verkregen. Als de testomstandigheden worden gewijzigd of andere apparatuur wordt gebruikt, zullen de drempel- en controlewaarden dan ook wellicht verschillen. Daarom moeten de methodologie en de drempelwaarden voor de weerstand worden gekalibreerd door een aantal stoffen voor bekwaamheidstoetsing te testen die worden gekozen uit de stoffen die bij de valideringsstudie zijn gebruikt (8) (9) of uit vergelijkbare chemische klassen als de stoffen die worden bestudeerd. In tabel 1 is een verzameling geschikte stoffen voor bekwaamheidstoetsing opgenomen.

Kleurstofbindingsmethoden

25. Blootstelling aan bepaalde niet-corrosieve materialen kan leiden tot een daling van de weerstand tot onder de drempelwaarde van 5 kΩ, waardoor ionen het stratum corneum kunnen passeren en de elektrische weerstand daalt (9). Neutrale organische stoffen en stoffen met oppervlakteactieve eigenschappen (zoals detergenten, emulgatoren en andere oppervlakteactieve stoffen) kunnen huidlipiden verwijderen waardoor de permeabiliteit van de barrière voor ionen toeneemt. Dit betekent dat er, als de TEW-waarden van die chemische stoffen lager zijn dan 5 kΩ of rond deze waarde liggen en er geen sprake is van visueel waarneembare schade van de huidschijfjes, een bepaling van de kleurstofpenetratie bij de controles en de behandelde weefsels moet worden uitgevoerd om vast te stellen of de gemeten TEW-waarden het gevolg zijn van een toegenomen permeabiliteit van de huid of huidcorrosie (7) (9). Wanneer in het laatste geval het stratum corneum beschadigd is, penetreert de kleurstof sulforhodamine B snel na aanbrengen op het huidoppervlak en kleurt deze het weefsel daaronder. Deze specifieke kleurstof is stabiel voor een breed scala van stoffen en wordt niet beïnvloed door onderstaande extractieprocedure.

Aanbrengen en verwijderen van de kleurstof sulforhodamine B

26. Na de TEW-bepaling wordt de magnesiumsulfaatoplossing uit de buis verwijderd en wordt de huid zorgvuldig onderzocht op zichtbare beschadiging. Als er geen zichtbare significante beschadiging is (bv. perforatie), wordt 150 µl van een 10 %-verdunning (g/v) van de kleurstof sulforhodamine B (Acid Red 52; C.I. 45100; CAS-nummer 3520-42-1) in gedestilleerd water gedurende 2 uur op het oppervlak van de epidermis van elk huidschijfje aangebracht. De huidschijfjes worden vervolgens gedurende ongeveer 10 seconden met leidingwater van ten hoogste kamertemperatuur gewassen 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 gedeïoniseerd water (8 ml) gelegd. De flesjes worden gedurende 5 minuten zachtjes geschud om eventueel nog resterende ongebonden kleurstof te verwijderen. Daarna wordt deze wasprocedure 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.

27. Na incubatie wordt elk huidschijfje verwijderd en weggegooid en wordt de resterende oplossing gedurende 8 minuten bij 21 °C gecentrifugeerd (relatieve centrifugale kracht ~ 175 × g).

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 565 nm gemeten.

Berekening van het kleurstofgehalte

28. Het gehalte aan de kleurstof sulforhodamine B per schijfje wordt berekend uit de OD-waarden (9) (de molaire extinctiecoëfficiënt van de kleurstof sulforhodamine B bij 565 nm = $8,7 \times 10^4$; molecuulgewicht = 580). Het gehalte aan de kleurstof wordt voor elk huidschijfje bepaald door een geschikte kalibratiecurve te gebruiken en vervolgens wordt voor de duplo's een gemiddeld kleurstofgehalte berekend.

Aanvaardbaarheidscriteria

29. De gemiddelde TEW-resultaten worden geaccepteerd als de parallelle positieve en negatieve controlewaarden binnen het voor de methode in het testlaboratorium aanvaardbare bereik liggen. Het aanvaardbare weerstandsbereik voor de in het voorgaande beschreven methodologie en apparatuur wordt in onderstaande tabel vermeld:

Controle	Stof	Weerstandsbereik (kΩ)
Positief	10 M zoutzuur	0,5 - 1,0
Negatief	Gedestilleerd water	10 - 25

30. De gemiddelde resultaten voor de kleurstofbinding worden geaccepteerd, mits de parallelle controlewaarden binnen het voor de methode aanvaardbare bereik liggen. Het voorgestelde aanvaardbare bereik voor het kleurstofgehalte bij de controlestoffen voor de in het voorgaande beschreven methodologie en apparatuur wordt in onderstaande tabel vermeld:

Controle	Stof	Bereik kleurstofgehalte (µg/schijf)
Positief	10 M zoutzuur	40 - 100
Negatief	Gedestilleerd water	15 - 35

Interpretatie van resultaten

31. De drempelwaarde voor de TEW die als scheiding tussen corrosieve en niet-corrosieve teststoffen fungeert, werd tijdens het optimaliseren van de testmethode bepaald, tijdens de prevalideringsfase getest en bij een formele valideringsstudie bevestigd.

32. Het voorspellingsmodel voor de TEW-testmethode voor huidcorrosie met rattenhuid (9) (19) in overeenstemming met het VN-GHS/CLP-classificatiesysteem is als volgt:

De teststof wordt als niet-corrosief voor de huid beschouwd:
i) als de gemiddelde, voor de teststof verkregen TEW-waarde hoger dan (>) 5 kΩ is of
ii) als de gemiddelde, voor de teststof verkregen TEW-waarde niet hoger dan (≤) 5 kΩ is en

- de huidschijfjes geen duidelijke beschadiging (bv. perforatie) vertonen en
- het gemiddelde kleurstofgehalte van het schijfje lager is dan (<) het gemiddelde kleurstofgehalte van het schijfje van de parallel behandelde positieve controle met 10 M HCl (zie punt 30 voor positieve controlewaarden).

De teststof wordt als corrosief voor de huid beschouwd:
i) als de gemiddelde, voor de teststof verkregen TEW-waarde niet hoger dan (≤) 5 kΩ is en de huidschijfjes duidelijk beschadigd (bv. geperforeerd) zijn of
ii) als de gemiddelde, voor de teststof verkregen TEW-waarde niet hoger dan (≤) 5 kΩ is en

- de huidschijfjes geen duidelijke beschadiging (bv. perforatie) vertonen maar
- het gemiddelde kleurstofgehalte van het schijfje ten minste gelijk is aan (≥) het gemiddelde kleurstofgehalte van het schijfje van de parallel behandelde positieve controle met 10 M HCl (zie punt 30 voor positieve controlewaarden).

33. Een testrun (experiment) bestaande uit ten minste drie duplo-huidschijfjes zou voldoende moeten zijn voor een teststof, indien de indeling ervan ondubbelzinnig is. Echter, bij grensgevallen zoals niet-concordante metingen van duplo's en/of een gemiddelde TEW van 5 ± 0,5 kΩ, moet een tweede, onafhankelijk(e) testrun (experiment) worden overwogen, en een derde in geval van niet-concordante resultaten tussen de eerste twee testruns (experimenten).

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

34. Weerstanden (kΩ) en, indien van toepassing, kleurstofgehalten (µg/schijfje) voor de teststof en de positieve en negatieve controles moeten in tabelvorm worden gerapporteerd, met vermelding van de gegevens voor elk afzonderlijke duploschijfje in elke testrun (elk experiment) en gemiddelden ± standaarddeviatie. Alle duplobepalingen moeten worden gerapporteerd. Voor elke teststof moet de waargenomen schade van de huidschijfjes worden gerapporteerd.

Testverslag

35. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof en controlestoffen:

- stof die uit één component bestaat: chemische identificatiegegevens, zoals IUPAC- of CAS-naam, CAS-nummer, SMILES- of InChI-code, structuurformule, zuiverheid, chemische identiteit van onzuiverheden, indien van toepassing en praktisch haalbaar enz.;
- stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB en mengsel: voor zover mogelijk, karakterisering aan de hand van chemische identiteit (zie hierboven), kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen van de bestanddelen;
- fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water en aanvullende relevante fysisch-chemische eigenschappen;

- bron, partijnummer indien beschikbaar;
- behandeling van de teststof/controlestof voorafgaand aan het testen, indien van toepassing (bv. opwarming, malen);
- stabiliteit van de teststof, uiterste gebruiksdatum, of datum voor heranalyse, indien bekend;
- bewaaromstandigheden.

Proefdieren:

- gebruikte stam en geslacht;
- leeftijd van de dieren wanneer ze als donordieren worden gebruikt;
- herkomst, leefomstandigheden, voeding enz.;
- gedetailleerde gegevens over het prepareren van de huid.

Testomstandigheden:

- kalibratiecurven voor de testapparatuur;
- kalibratiecurven voor de resultaten voor de kleurstofbindingstest, de bandbreedte gebruikt voor het meten van OD-waarden, en het lineariteitsbereik voor de OD van het meettoestel (bv. spectrofotometer), indien van toepassing;
- gedetailleerde gegevens over de voor de TEW-metingen gebruikte testprocedure;
- gedetailleerde gegevens over de voor de bepaling van de kleurstofbinding gebruikte testprocedure, indien van toepassing;
- gebruikte testdoses, duur van de blootstellingsperiode(n) en blootstellingstemperatu(u)r(en);
- gedetailleerde gegevens over de gebruikte procedure voor het wassen na de blootstellingsperiode;
- het aantal gebruikte duplo-huidschijfjes per teststof en controles (positieve en negatieve controle);
- een beschrijving van eventuele modificaties van de testprocedure;
- verwijzingen naar historische gegevens over het model. Hieronder moet ten minste informatie zijn over:
    i) de aanvaardbaarheid van de TEW-waarden (in kΩ) voor de positieve en negatieve controles met verwijzing naar de weerstandsbereiken van negatieve en positieve controles;
    ii) de aanvaardbaarheid van de kleurstofgehalten (in µg/schijfje) voor de positieve en negatieve controles met verwijzing naar de kleurstofgehaltebereiken van negatieve en positieve controles;
    iii) de aanvaardbaarheid van de testresultaten met verwijzing naar de historische variabiliteit tussen de duplo-huidschijfjes;
- een beschrijving van de gehanteerde beslissingscriteria/het toegepaste voorspellingsmodel.

Resultaten:

- een tabel met gegevens van de TEW- en kleurstofbindingsbepalingen (indien van toepassing) voor de afzonderlijke teststoffen en controles, voor elke testrun (elk experiment) en elk duplo-huidschijfje (afzonderlijke dieren en afzonderlijke huidmonsters), gemiddelden, standaarddeviaties en variatiecoëfficiënten;
- een beschrijving van waargenomen effecten;
- de afgeleide indeling met vermelding van het gebruikte voorspellingsmodel/de gehanteerde beslissingscriteria.

Bespreking van de resultaten

Conclusies

LITERATUUR

(1) Verenigde Naties (VN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, VN New York en Genève, 2013. Beschikbaar op: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

(2) Hoofdstuk B.4 van deze bijlage, Acute huidirritatie/corrosie.

(3) Hoofdstuk B.40 bis van deze bijlage, In-vitrohuidmodel.

(4) Hoofdstuk B.65 van deze bijlage, In-vitrohuidcorrosie: testmethode op basis van de membraanbarrière.

(5) Hoofdstuk B.46 van deze bijlage, In-vitrohuidirritatie: testmethode met gereconstrueerde humane epidermis.

(6) OESO (2014). Guidance document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(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., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.*ATLA* 23, 219-255.

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

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

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

(11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of

Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(12) EC-CEVMA (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneos Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), gepubliceerd door het raadgevend wetenschappelijk comité van het Europees Centrum voor de validatie van alternatieve methoden (ESAC10), 3 april 1998.

(13) CEVMA (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

(14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(15) OESO (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 218). Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

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

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

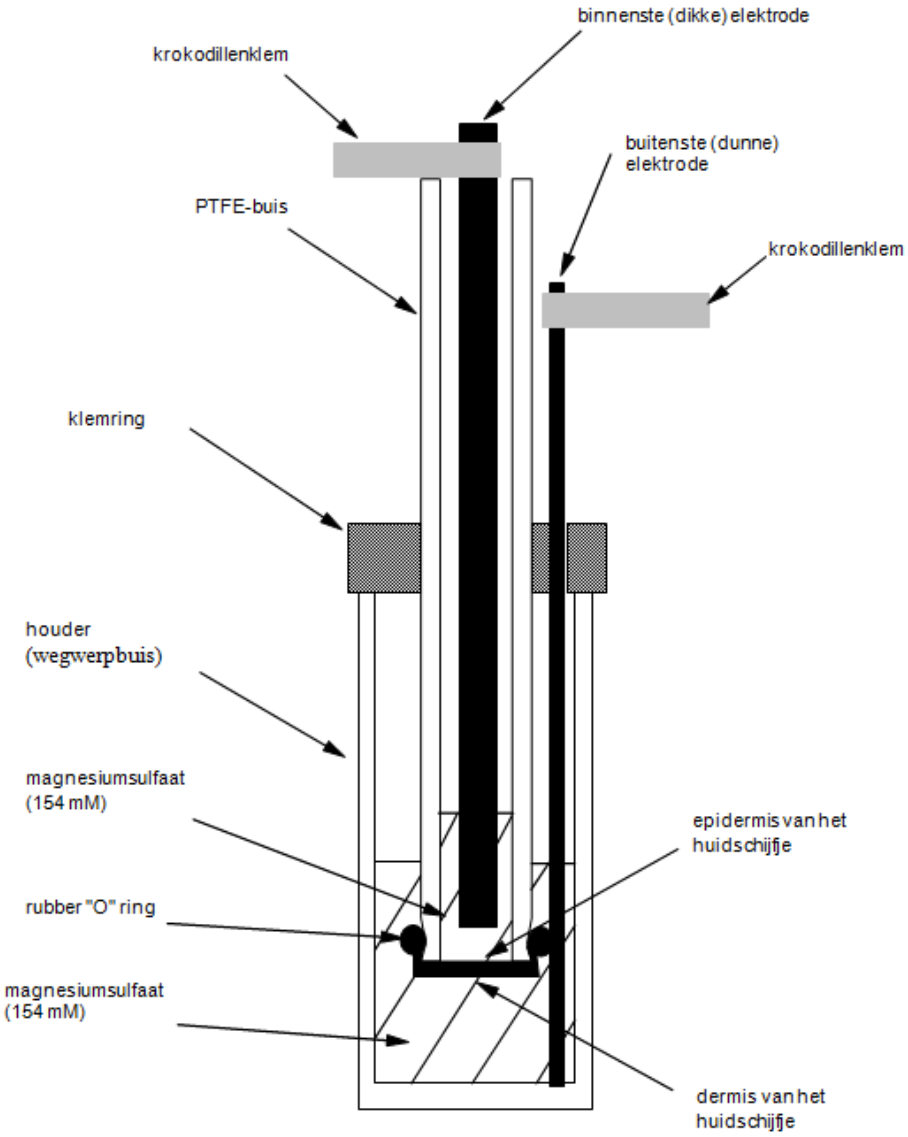
(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher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

(19) TER SOP (December 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.

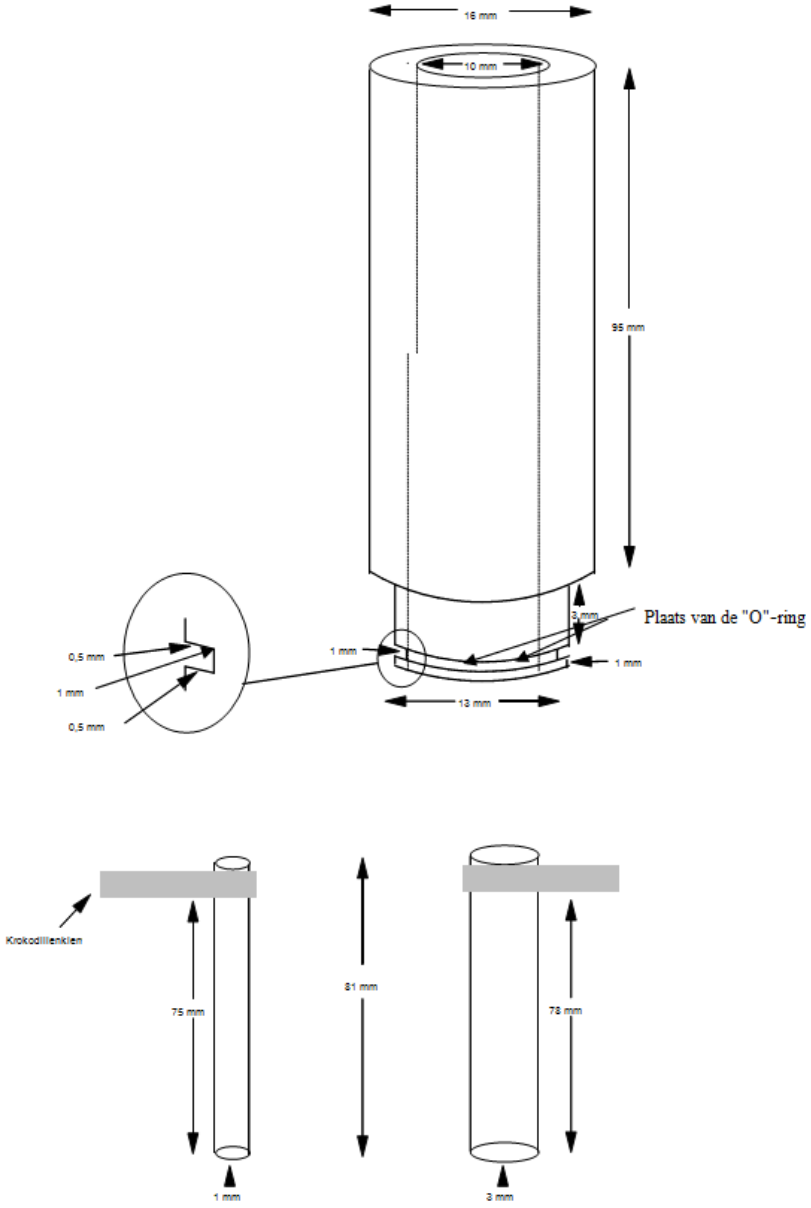
(20) OESO (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment.

Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

FIGUUR 1: APPARATUUR VOOR DE TEW-BEPALING BIJ RATTENHUID



FIGUUR 2: AFMETINGEN VAN DE PTFE-BUIS (POLYTETRAFLUORETHEEN) EN HET RECEPTORCOMPARTIMENT EN DE GEBRUIKTE ELEKTRODEN



Kritische factoren van bovenstaande apparatuur:

- de binnendiameter van de PTFE-buis;
- de lengte van de elektroden in vergelijking met de PTFE-buis en het receptorcompartiment, zodat de elektroden het huidschijfje niet mogen raken en altijd een even lang stuk van de elektrode in contact met de $MgSO_4$-oplossing is;
- de hoeveelheid MgSO4-oplossing in het receptorcompartiment moet zodanig zijn dat het vloeistofniveau lager is dan in de PTFE-buis (zie figuur 1);

- het huidschijfje moet stevig genoeg op de PTFE-buis worden bevestigd, zodat de elektrische weerstand een reële maat voor de eigenschappen van de huid is.

Aanhangsel

DEFINITIES

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een testmethode, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden uitgevoerd. De betrouwbaarheid wordt beoordeeld door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid (20).

C: corrosief.

Chemische stof: een stof of een mengsel.

Concordantie: een maat voor de prestaties van de testmethode voor testmethoden die een categoriale uitkomst geven en het is één aspect van relevantie. Deze term en de term "nauwkeurigheid" worden soms door elkaar gebruikt; de term wordt gedefinieerd als het percentage van alle geteste chemische stoffen die correct als positief of negatief worden geclassificeerd. De concordantie is sterk afhankelijk van de prevalentie van positieven in de typen teststoffen die worden onderzocht (20).

Gevoeligheid: het percentage van alle positieve/actieve chemische stoffen dat door middel van de testmethode correct wordt ingedeeld. Dit is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert en is een belangrijke factor voor de beoordeling van de relevantie van een testmethode (20).

GHS (mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen (VN)): een systeem voor de indeling van chemische stoffen (stoffen en mengsels) op basis van gestandaardiseerde soorten en niveaus van gevaren van fysische aard en gevaren voor de gezondheid en het milieu, en dat de desbetreffende voorlichtingselementen bepaalt, zoals pictogrammen, signaalwoorden, gevarenaanduidingen, voorzorgsmaatregelen en veiligheidsinformatiebladen, waarmee informatie over de schadelijke effecten van de stoffen kenbaar wordt gemaakt teneinde mensen (waaronder werkgevers, werknemers, transporteurs, consumenten en spoedhulpverleners) en het milieu te beschermen (1).

Huidcorrosie in vivo: het ontstaan van een irreversibele beschadiging van de huid, namelijk zichtbare necrose door de epidermis heen in de dermis, na het aanbrengen van een teststof gedurende ten hoogste vier uur. Corrosie-reacties worden gekenmerkt door zweren, bloedingen, bloedkorsten en, tegen het eind van de observatieperiode van 14 dagen, ontkleuring door bleking van de huid, gebieden met volledige haaruitval en littekens. Om twijfelachtig letsel te evalueren moet histopathologie worden overwogen.

IATA: Integrated Approach on Testing and Assessment (geïntegreerde test- en beoordelingsbenadering).

Mengsel: een mengsel of oplossing bestaande uit twee of meer stoffen.

Nauwkeurigheid: de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de testmethode en erkende referentiewaarden. Dit is een maat voor de prestaties van de testmethode

en één aspect van relevantie. Deze term en de term "concordantie", waaronder het percentage correcte uitkomsten van een testmethode wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt (20).

NC: niet-corrosief.

OD: optische dichtheid.

PC: positieve controle, een monster met alle bestanddelen van een testsysteem dat met een stof behandeld werd waarvan bekend is dat deze een positieve respons opwekt. Om te verzekeren dat variabiliteit in de positievecontrolerespons doorheen de tijd kan worden beoordeeld, mag de grootte van de positieve respons niet buitensporig zijn.

Prestatienormen: normen, gebaseerd op een gevalideerde testmethode, die de basis vormen voor de beoordeling van de vergelijkbaarheid van een voorgestelde, in mechanistisch en functioneel opzicht gelijksoortige testmethode. Hieronder begrepen zijn: i) essentiële componenten van de testmethode; ii) een minimumlijst van referentiestoffen die zijn gekozen uit de stoffen die zijn gebruikt om de aanvaardbare prestaties van de gevalideerde testmethode aan te tonen; iii) de soortgelijke betrouwbaarheids- en nauwkeurigheidsniveaus die door de voorgestelde testmethode moeten worden gehaald wanneer ze worden beoordeeld aan de hand van de minimumlijst van referentiestoffen; deze waarden zijn gebaseerd op de waarden die voor de gevalideerde testmethode zijn verkregen.

Relevantie: beschrijving van het verband van de testmethode met het te onderzoeken effect en of de test betekenis heeft en nuttig is voor een bepaald doel. Het is de mate waarin de testmethode het te onderzoeken biologische effect correct meet of voorspelt. Relevantie omvat een beoordeling van de nauwkeurigheid (concordantie) van een testmethode (20).

Specificiteit: het percentage van alle negatieve/niet-actieve chemische stoffen dat door middel van de testmethode correct wordt ingedeeld. Dit is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert en is een belangrijke factor voor de beoordeling van de relevantie van een testmethode (20).

Stof: een chemisch element en de verbindingen ervan, zoals zij voorkomen in natuurlijke toestand of bij de productie ontstaan, met inbegrip van alle additieven die nodig zijn voor het behoud van de stabiliteit ervan en alle onzuiverheden ten gevolge van het toegepaste procedé, doch met uitzondering van elk oplosmiddel dat kan worden afgescheiden zonder aantasting van de stabiliteit van de stof of wijziging van de samenstelling ervan.

Stof die uit één component bestaat: een stof die wordt gekenmerkt door haar kwantitatieve samenstelling en waarin een hoofdcomponent aanwezig is in een concentratie van ten minste 80 % (w/w).

Stof die uit meerdere componenten bestaat: een stof die wordt gekenmerkt door haar kwantitatieve samenstelling en waarin meer dan één hoofdcomponent aanwezig is in een concentratie van ≥ 10 % (w/w) en < 80 % (w/w). Een stof die uit meerdere componenten bestaat, is het resultaat van een fabricageproces. Het verschil tussen mengsels en stoffen die uit meerdere componenten bestaan, is dat mengsels worden verkregen door twee of meer stoffen zonder chemische reactie met elkaar te vermengen. Een stof die uit meerdere componenten bestaat, is

het resultaat van een chemische reactie.

Testrun: één teststof die tegelijkertijd wordt getest in ten minste drie duplo-huidschijfjes.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

Transcutane elektrische weerstand (TEW): een maat voor de elektrische impedantie van de huid, uitgedrukt als elektrische weerstand in kilo-ohm. Dit is een eenvoudige en krachtige methode om de barrièrefunctie te bepalen door de passage van ionen door de huid met behulp van een brug van Wheatstone te registreren.

UVCB: stoffen met een onbekende of variabele samenstelling, complexe reactieproducten en biologische materialen.".

6) In deel B wordt hoofdstuk B.40 bis vervangen door:

"B.40 bis IN-VITROHUIDCORROSIE: TESTMETHODE MET GERECONSTRUEERDE HUMANE EPIDERMIS (RhE)

INLEIDING

1. Deze testmethode (TM) is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 431 (2016) van de OESO. Onder huidcorrosie wordt verstaan: het ontstaan van irreversibele schade aan de huid in de vorm van zichtbare necrose door de epidermis heen in de dermis, na het aanbrengen van een teststof (zoals gedefinieerd door het mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, GHS) van de Verenigde Naties (VN) (1) en Verordening (EU) nr. 1272/2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels (CLP-verordening)[1]). Deze bijgewerkte testmethode B.40 bis bevat een in-vitroprocedure voor het identificeren van niet-corrosieve en corrosieve stoffen en mengsels overeenkomstig het VN-GHS en de CLP-verordening. Bovendien is het aan de hand van deze methode mogelijk om corrosieve stoffen voor een deel in subcategorieën in te delen.

2. De bepaling van de potentiële huidcorrosiviteit van chemische stoffen ging meestal gepaard met het gebruik van proefdieren (TM B.4, gelijkwaardig aan OESO TG 404; oorspronkelijk vastgesteld in 1981, herzien in 1992, 2002, 2015) (2). Naast deze testmethode B.40 bis zijn er nog twee andere in-vitromethoden voor het testen van het potentieel voor huidcorrosie van chemische stoffen gevalideerd en goedgekeurd als TM B.40 (gelijkwaardig aan OESO TG 430) (3) en TM B.65 (gelijkwaardig aan OESO TG 435) (4). Daarnaast is de in-vitrotestmethode B.46 (gelijkwaardig aan OESO TG 439) (5) goedgekeurd voor het testen van het huidirritatiepotentieel. In een OESO-leidraad voor een geïntegreerde test- en beoordelingsbenadering (Integrated Approach on Testing and Assessment, IATA) voor huidcorrosie en -irritatie worden verschillende modules beschreven met gedeelde informatiebronnen en analyse-instrumenten. De IATA i) biedt richtsnoeren voor de integratie en het gebruik van bestaande gegevens die zijn verzameld met behulp van test- en niet-testmethoden om het potentieel voor huidirritatie en -corrosie van chemische stoffen te beoordelen en ii) draagt een benadering aan voor wanneer verder testen nodig is (6).

[1] Verordening (EG) nr. 1272/2008 van het Europees Parlement en de Raad van 16 december 2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels, tot wijziging en intrekking van de Richtlijnen 67/548/EEG en 1999/45/EG en tot wijziging van Verordening (EG) nr. 1907/2006, PB L 353 van 31.12.2008, blz. 1.

3. Deze testmethode heeft betrekking op huidcorrosie als eindpunt voor de menselijke gezondheid. Er wordt gebruikgemaakt van gereconstrueerde humane epidermis (RhE) (afkomstig van uit mensen verkregen niet-getransformeerde epidermiskeratinocyten), die nauwe overeenkomsten heeft met de histologische, morfologische, biochemische en fysiologische eigenschappen van de bovenste delen van de menselijke huid, d.w.z. de epidermis. De overeenkomstige testrichtlijn van de OESO werd oorspronkelijk vastgesteld in 2004, bijgewerkt in 2013 met meer testmethoden op basis van RhE-modellen en de mogelijkheid om de methoden te gebruiken als hulpmiddel voor het indelen van corrosieve chemische stoffen in subcategorieën, en bijgewerkt in 2015 met verwijzingen naar de IATA-leidraad en de toevoeging van een alternatieve procedure die kan worden gebruikt om de levensvatbaarheid te meten.

4. Er zijn in deze testmethode vier gevalideerde, in de handel verkrijgbare RhE-modellen opgenomen. Voor twee van deze in de handel verkrijgbare testmodellen, EpiSkin™ Standard Model (SM) en EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (hierna aangeduid als de Validated Reference Methods (VRM's), gevalideerde referentiemethoden) zijn prevalideringsstudies uitgevoerd (7), gevolgd door een formele valideringsstudie voor de bepaling van huidcorrosie (8) (9) (10) (11) (12). De resultaten van deze studies hebben geleid tot de aanbeveling dat de twee voornoemde VRM's met het oog op regelgeving konden worden gebruikt voor het onderscheiden van corrosieve (C) en niet-corrosieve (NC) stoffen, en dat EpiSkin™ bovendien kon worden gebruikt als hulpmiddel voor het indelen van corrosieve stoffen in subcategorieën (13) (14) (15). Twee andere in de handel verkrijgbare in-vitrotestmethoden met RhE betreffende huidcorrosie hebben soortgelijke resultaten opgeleverd als de VRM EpiDerm™ overeenkomstig op prestatienormen gebaseerde validering (16) (17) (18). Dit zijn SkinEthic™ RHE[1] en epiCS® (voorheen EST-1000 genaamd) en deze kunnen ook met het oog op regelgeving worden gebruikt voor het onderscheiden van corrosieve en niet-corrosieve stoffen (19) (20). Tussen 2012 en 2014 hebben de fabrikanten van RhE-modellen post-valideringsstudies uitgevoerd met een bijgesteld protocol dat corrigeert voor storingen als gevolg van niet-specifieke MTT-reductie door de teststoffen, waardoor de prestaties van de modellen wat betreft het onderscheiden van C en NC zijn verbeterd en de indeling van corrosieve stoffen in subcategorieën wordt ondersteund (21) (22). De post-valideringsgegevens die waren gegenereerd met EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE en epiCS® zijn aan nadere statistische analyses onderworpen om alternatieve voorspellingsmodellen te identificeren die het voorspellend vermogen voor de indeling in subcategorieën hebben verbeterd (23).

---

[1] Voor alle modellen die gebaseerd zijn op RhE-technologie wordt de afkorting RhE (=gereconstitueerde humane epidermis) gebruikt. De afkorting RHE, die wordt gebruikt in verband met het SkinEthic™-model, betekent hetzelfde, maar wordt als onderdeel van de naam van deze specifieke testmethode in de handel met drie hoofdletters gespeld.

5. Voordat een voorgestelde soortgelijke of gewijzigde in-vitro-RhE-testmethode voor huidcorrosie anders dan de VRM's kan worden gebruikt met het oog op regelgeving, moeten de betrouwbaarheid, relevantie (nauwkeurigheid) en beperkingen ervan voor het voorgestelde gebruik bepaald worden om te waarborgen dat de methode vergelijkbaar is met de VRM's, overeenkomstig de vereisten van de prestatienormen (24) die zijn vastgelegd overeenkomstig de beginselen van OESO-leidraad nr. 34 (25). De wederzijdse aanvaarding van gegevens is pas gewaarborgd wanneer voorgestelde nieuwe of bijgewerkte testmethoden volgens de prestatienormen zijn geëvalueerd en zijn opgenomen in de overeenkomstige testrichtlijn. De in die testrichtlijn opgenomen testmodellen kunnen worden gebruikt om te voldoen aan de eisen die aan landen worden gesteld wat betreft de testresultaten voor een in-vitrotestmethode voor huidcorrosie, en in aanmerking te komen voor wederzijdse aanvaarding van gegevens.

DEFINITIES

6. Gebruikte definities worden gegeven in aanhangsel 1.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

7. Met deze testmethode kunnen niet-corrosieve en corrosieve stoffen en mengsels worden geïdentificeerd overeenkomstig het VN-GHS en de CLP-verordening. Bovendien ondersteunt de testmethode de indeling van corrosieve stoffen en mengsels in de optionele subcategorie 1A, overeenkomstig het VN-GHS (1), en een combinatie van de subcategorieën 1B en 1C (21) (22) (23). Deze testmethode heeft als beperking dat er vanwege de beperkte set van algemeen bekende in vivo corrosieve chemische stoffen die onder subcategorie 1C vallen, geen onderscheid kan worden gemaakt tussen subcategorieën voor huidcorrosie 1B en 1C overeenkomstig het VN-GHS en de CLP-verordening. De testmodellen EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE en epiCS® kunnen gebruikt worden voor indeling in subcategorieën (d.w.z. 1A versus 1B-en-1C versus NC).

8. De valideringsstudie, waarin een breed spectrum aan chemische stoffen, voornamelijk individuele stoffen, is getest, ondersteunt de in deze testmethode opgenomen testmodellen wanneer ze worden gebruikt voor het identificeren van niet-corrosieve en corrosieve stoffen; de empirische databank van de valideringsstudie telt 60 stoffen die een breed spectrum aan chemische klassen bestrijken (8) (9) (10). De ontwikkelaars van de testmethode hebben tests uitgevoerd om de gevoeligheid, specificiteit, nauwkeurigheid en intralaboratoriumreproduceerbaarheid van de bepaling voor de indeling in subcategorieën aan te tonen en de resultaten daarvan zijn beoordeeld door de OESO (21) (22) (23). Op basis van de globale beschikbare gegevens is de testmethode van toepassing op een groot aantal verschillende chemische klassen en fysische toestanden, waaronder vloeistoffen, halfvaste stoffen, vaste stoffen en wassen. Vloeistoffen mogen waterig of niet-waterig zijn; vaste stoffen mogen al dan niet in water oplosbaar zijn. Waar mogelijk moeten vaste stoffen tot een fijn poeder worden vermalen voordat ze worden aangebracht; verdere voorbehandeling van het

monster is niet nodig. Wanneer kan worden aangetoond dat bepaalde in deze testmethode opgenomen testmodellen niet op een specifieke categorie van teststoffen kunnen worden toegepast, mogen deze niet voor die specifieke categorie van stoffen worden gebruikt. Voorts wordt aangenomen dat deze testmethode, in het verlengde van de toepasbaarheid ervan op stoffen, ook op mengsels kan worden toegepast. Mengsels vertegenwoordigen evenwel een breed spectrum aan categorieën en samenstellingen en er is vooralsnog slechts beperkte informatie over het testen van mengsels beschikbaar. Wanneer kan worden aangetoond dat de testmethode niet op een specifieke categorie van mengsels kan worden toegepast (bv. aan de hand van een strategie zoals voorgesteld in (26)), mag de testmethode dan ook niet voor die specifieke categorie van mengsels worden gebruikt. Voordat de testmethode wordt gebruikt op een mengsel om gegevens te genereren voor een beoogd regelgevingsdoel, moet worden nagegaan of, en zo ja, waarom deze methode betrouwbare resultaten oplevert voor dat doel. Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is. Gassen en aerosolen zijn nog niet gevalideerd in valideringsstudies (8) (9) (10). Hoewel het denkbaar is dat deze met behulp van RhE-technologie kunnen worden getest, staat de huidige testmethode het testen van gassen en aerosolen niet toe.

9. Teststoffen die licht absorberen in hetzelfde bereik als MTT-formazan, en teststoffen die de vitale kleurstof MTT rechtstreeks kunnen reduceren (tot MTT formazan), kunnen de metingen van de levensvatbaarheid van het weefsel verstoren, zodat het bij deze stoffen nodig is om aangepaste controles te gebruiken met het oog op correcties. Wat voor aangepaste controles er eventueel nodig zijn hangt af van het soort storing door de teststof en de procedure die wordt gebruikt voor het meten van MTT-formazan (zie punten 25-31).

10. Hoewel deze testmethode geen toereikende informatie over huidirritatie oplevert, moet worden opgemerkt dat TM B.46 specifiek betrekking heeft op het gezondheidseffect huidirritatie in vitro en gebaseerd is op hetzelfde RhE-testsysteem, maar dan met een ander protocol (5). Voor een volledige beoordeling van lokale huideffecten na één blootstelling op de huid moet de OESO-leidraad voor een geïntegreerde test- en beoordelingsbenadering (Integrated Approach on Testing and Assessment, IATA) worden geraadpleegd (6). Deze IATA behelst de uitvoering van in-vitrotests op huidcorrosie (zoals in deze testmethode wordt beschreven) en huidirritatie voordat tests op levende dieren worden overwogen. Voor het gebruik van menselijke huid gelden nationale en internationale ethische overwegingen en voorwaarden.

PRINCIPE VAN DE TEST

11. De teststof wordt plaatselijk aangebracht op een driedimensionaal RhE-model dat bestaat uit niet-getransformeerde, uit mensen verkregen epidermiskeratinocyten, die gekweekt zijn om een meerlagig, hooggedifferentieerd model van de menselijke epidermis te vormen. Het model bestaat uit een georganiseerd stratum basale, stratum spinosum en stratum granulosum, en een meerlagig stratum corneum, die intercellulaire lamelvormige lipidelagen bevatten die

representatief zijn voor de belangrijkste lipideklassen, analoog aan die in vivo worden aangetroffen.

12. De RhE-testmethode is gebaseerd op de aanname dat corrosieve chemische stoffen door diffusie of erosie het stratum corneum kunnen penetreren en cytotoxisch zijn voor de cellen in de onderliggende cellagen. De cellevensvatbaarheid wordt gemeten door enzymatische omzetting van de vitale kleurstof MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromide, thiazolylblauw tetrazoliumbromide; CAS-nummer 298-93-1] in een blauw formazanzout dat kwantitatief wordt gemeten na extractie uit weefsels (27). Corrosieve chemische stoffen worden geïdentificeerd op hun vermogen om de cellevensvatbaarheid te reduceren tot minder dan gedefinieerde drempelwaarden (zie punten 35 en 36). Er is aangetoond dat met de testmethode voor huidcorrosie op basis van RhE een prognose kan worden gegeven voor de in-vivobepaling van corrosieve effecten op de huid bij het konijn volgens TM B.4 (2).

AANTONING VAN BEKWAAMHEID

13. Voordat de vier gevalideerde RhE-testmodellen die aan deze testmethode voldoen, routinematig worden gebruikt, moeten laboratoria technische hun bekwaamheid aantonen door een correcte indeling van de twaalf in tabel 1 vermelde stoffen voor bekwaamheidstoetsing. Wanneer een methode wordt gebruikt voor indeling in subcategorieën, moet ook de juiste subcategorisering worden aangetoond. Wanneer een stof uit de lijst niet beschikbaar is of indien zulks gerechtvaardigd is, kan een andere stof waarvoor voldoende in-vivo- en in-vitroreferentiegegevens beschikbaar zijn, worden gebruikt (bv. uit de lijst met referentiestoffen (24)), mits dezelfde selectiecriteria als in tabel 1 worden toegepast.

Tabel 1: Lijst van stoffen voor bekwaamheidstoetsing[1]

Stof	CAS RN	Chemische klasse[2]	VN GHS/CLP-cat. op basis van in-vivoresultaten[3]	VRM -cat. op basis van in-vitroresultaten[4]	MTT - reducerende stof[5]	Fysische toestand
Stoffen die in vivo corrosief zijn, subcategorie 1A						
Broomazijnzuur	79-08-3	Organisch zuur	1A	(3) 1A	--	S
Boortrifluoridedihydraat	13319-75-0	Anorganisch zuur	1A	(3) 1A	--	Vloeistof
Fenol	108-95-2	Fenol	1A	(3) 1A	--	S
Dichlooracetyl-chloride	79-36-7	Elektrofiel	1A	(3) 1A	--	Vloeistof
Stoffen die in vivo corrosief zijn, combinatie van subcategorieën 1B en 1C						
Glyoxylzuurmonohydraat	563-96-2	Organisch zuur	1B-en-1C	(3) 1B-en-1C	--	S
Melkzuur	598-82-3	Organisch zuur	1B-en-1C	(3) 1B-en-1C	--	Vloeistof
Ethanolamine	141-43-5	Organische base	1B	(3) 1B-en-1C	J	Viskeus

Zoutzuur (14,4 %)	7647-01-0	Anorganisch zuur	1B-en-1C	(3) 1B-en-1C	--	Vloeistof
Stoffen die in vivo niet corrosief zijn						
Fenethylbromide	103-63-9	Elektrofiel	NC	(3) NC	J	Vloeistof
4-Amino-1,2,4-triazool	584-13-4	Organische base	NC	(3) NC	--	S
4- (Methylthio)-benzaldehyd	3446-89-7	Elektrofiel	NC	(3) NC	J	Vloeistof
Laurinezuur	143-07-7	Organisch zuur	NC	(3) NC	--	S

Afkortingen: CAS RN = registratienummer van de Chemical Abstract Service; VRM = Validated Reference Method (gevalideerde referentiemethode); NC = niet-corrosief

[1] De stoffen voor bekwaamheidstoetsing, eerst gesorteerd op corrosieve stoffen versus niet-corrosieve stoffen, vervolgens op subcategorie voor corrosieve stoffen en vervolgens op chemische klasse, werden geselecteerd uit de stoffen die waren gebruikt in de valideringsstudies van het Europees Centrum voor de validatie van alternatieve methoden (CEVMA) voor EpiSkin™ en EpiDerm™ (8) (9) (10) en uit de postvalideringsstudies op basis van gegevens die werden aangeleverd door de ontwikkelaars van EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ en epiCS® (23). Tenzij anders aangegeven zijn de stoffen getest in de zuiverheidsgraad waarin ze in de handel kunnen worden gekocht (8) (10). Voor zover mogelijk omvat de selectie stoffen die: i) het hele spectrum aan corrosieve responsen bestrijken (bv. niet-corrosieve stoffen; zwak tot sterk corrosieve stoffen) die de VRM's kunnen meten of voorspellen; ii) representatief zijn voor de chemische klassen die in de valideringsstudies zijn gebruikt; iii) een goed omschreven chemische structuur hebben; iv) reproduceerbare resultaten opleveren in de VRM; v) eenduidige resultaten opleveren in de in-vivoreferentietestmethode; vi) in de handel verkrijgbaar zijn; en waaraan vii) geen buitensporige verwijderingskosten verbonden zijn.

[2] Chemische klasse toegekend door Barratt *et al.* (8).

[3] De overeenkomstige VN-verpakkingsgroepen voor de VN-GHS/CLP-categorieën 1A, 1B en 1C zijn respectievelijk I, II en III.

[4] De in deze tabel vermelde VRM-in-vitroprognoses werden verkregen met de testmodellen EpiSkin™ en EpiDerm™ (VRM's) in postvalideringsstudies uitgevoerd door de ontwikkelaars van de testmethode.

[5] De levensvatbaarheidswaarden die werden verkregen in de valideringsstudies voor huidcorrosie van het CEVMA zijn niet gecorrigeerd voor rechtstreekse MTT-reductie (er werden in de valideringsstudies geen controles met gedode weefsels uitgevoerd). De door de ontwikkelaars van de testmethode gegenereerde postvalideringsgegevens die in deze tabel zijn weergegeven, zijn verkregen met aangepaste controles (23).

14. Als onderdeel van deze bekwaamheidsdemonstratie wordt aanbevolen dat de gebruiker na ontvangst de door de fabrikant van het RhE-model gespecificeerde barrière-eigenschappen van de weefsels verifieert. Dit is in het bijzonder van belang indien weefsels over lange afstanden/gedurende lange perioden zijn vervoerd. Zodra een testmethode met succes is opgezet en de bekwaamheid in het gebruik ervan is aangetoond, behoeft een dergelijke verificatie niet routinematig te worden uitgevoerd. Echter, indien een testmethode routinematig wordt gebruikt, wordt aanbevolen om de barrière-eigenschappen op regelmatige basis te blijven toetsen.

PROCEDURE

15. Het onderstaande is een algemene beschrijving van de componenten en procedures van de RhE-testmodellen voor beoordeling van huidcorrosie die door deze testmethode worden bestreken. De RhE-modellen die zijn bekrachtigd als wetenschappelijk geldig voor gebruik in het kader

van deze testmethode, d.w.z. de modellen EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE en epiCS® (16) (17) (19) (28) (29) (30) (31) (32) (33) zijn in de handel verkrijgbaar. Er zijn voor deze vier RhE-modellen standaardwerkwijzen (SOP's) beschikbaar (34) (35) (36) (37). In aanhangsel 2 wordt een overzicht gegeven van de voornaamste componenten van de testmethode. Aanbevolen wordt om bij toepassing en gebruik van een van deze modellen in het laboratorium de relevante SOP's te raadplegen. Bij het testen met de vier RhE-testmodellen die door deze testmethode worden bestreken, moet aan de volgende voorwaarden worden voldaan:

COMPONENTEN VAN DE RHE-TESTMETHODE

Algemene voorwaarden

16. Om het epitheel op te bouwen moeten niet-getransformeerde humane keratinocyten worden gebruikt. Er moeten verschillende lagen levende epitheelcellen (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum) aanwezig zijn onder een functioneel stratum corneum. Het stratum corneum moet uit meerdere lagen bestaan en het vereiste lipideprofiel hebben, zodat een sterke en functionele barrière wordt gevormd waar cytotoxische ijkstoffen, bv. natriumdodecylsulfaat (SDS) of Triton X-100, niet snel doorheen kunnen dringen. De barrièrefunctie moet worden aangetoond en kan worden beoordeeld door de concentratie te bepalen waarin een ijkstof de weefsellevensvatbaarheid met 50 % doet dalen (IC_{50}) na een vaste blootstellingstijd, of door de blootstellingstijd te bepalen die nodig is om de cellevensvatbaarheid met 50 % te doen dalen (ET_{50}) bij aanbrenging van de ijkstof in een bepaalde, vaste concentratie (zie punt 18). De omsluitingseigenschappen van het model moeten voorkomen dat materiaal om het stratum corneum heen het levende weefsel kan bereiken. Dat zou een slecht model voor huidblootstelling opleveren. Het RhE-model mag niet verontreinigd zijn met bacteriën, virussen, mycoplasma of fungi.

Functionele voorwaarden

Levensvatbaarheid

17. De levensvatbaarheid van het weefsel wordt gekwantificeerd door middel van de MTT-test (27). De levensvatbare cellen van het RhE-weefselpreparaat reduceren de vitale kleurstof MTT tot een blauw MTT-formazanprecipitaat, dat vervolgens met isopropanol (of een vergelijkbaar oplosmiddel) uit het weefsel wordt geëxtraheerd. De optische densiteit (OD) van het extractieoplosmiddel alleen moet voldoende klein zijn, d.w.z. $OD < 0{,}1$. Het geëxtraheerde MTT-formazan kan worden gekwantificeerd met behulp van hetzij een meting van de standaard extinctie (OD) of een HPLC/UPLC-spectrofotometrieprocedure (38). Gebruikers van het RhE-model moeten waarborgen dat iedere gebruikte batch van het RhE-model voldoet aan gedefinieerde criteria voor de negatieve controle. Door de ontwikkelaar/leverancier van het RhE-model moet een aanvaardbaarheidsbereik (boven- en ondergrens) voor de OD-waarden in negatieve controle worden vastgesteld. In tabel 2 worden de aanvaardbaarheidsbereiken voor de OD-waarden in negatieve controle gegeven voor de vier gevalideerde RhE-testmodellen die in deze testmethode zijn opgenomen. Bij gebruik van HPLC/UPLC-spectrofotometrie moeten de

OD-bereiken in negatieve controle in tabel 2 als aanvaardbaarheidscriterium voor de negatieve controles worden gebruikt. Gedocumenteerd moet worden dat de weefsels die in de negatieve controle worden gebruikt, gedurende de volledige blootstellingsperiode in cultuur stabiel zijn (vergelijkbare OD-metingen opleveren).

Tabel 2: Aanvaardbaarheidsbereiken voor OD-waarden in negatieve controle ter controle van de batchkwaliteit

	Ondergrens aanvaardbaarheid	**Bovengrens aanvaardbaarheid**
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

Barrièrefunctie

18. Het stratum corneum met de daarin aanwezige lipiden moet sterk genoeg zijn om snelle penetratie van bepaalde cytotoxische ijkstoffen, bv. SDS of Triton X-100, te weerstaan, wat wordt beoordeeld aan de hand van de IC_{50} of ET_{50} (tabel 3). Voor elke batch van het gebruikte RhE-model moet de ontwikkelaar/leverancier van het RhE-model bij levering van de weefsels aan de eindgebruiker de barrièrefunctie aantonen (zie punt 21).

Morfologie

19. Het RhE-model moet aan een histologisch onderzoek onderworpen worden om aan te tonen dat de meerlagige structuur van het weefsel op die van de menselijke epidermis lijkt, met een stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum en stratum corneum, en een lipideprofiel vertoont dat vergelijkbaar is met dat van de menselijke epidermis. Voor elke batch van het gebruikte RhE-model moet de ontwikkelaar/leverancier van het RhE-model bij levering van de weefsels aan de eindgebruiker een histologisch onderzoek overleggen waarin wordt aangetoond dat de weefsels de juiste morfologie hebben (zie punt 21).

Reproduceerbaarheid

20. Gebruikers van de testmethoden moeten de reproduceerbaarheid van de testmethoden in de tijd met de positieve en negatieve controles aantonen. Bovendien mag de testmethode alleen worden gebruikt als de ontwikkelaar/leverancier van het RhE-model gegevens verstrekt die aantonen dat de resultaten met corrosieve en niet-corrosieve chemische stoffen in bv. de lijst met stoffen voor bekwaamheidstoetsing (tabel 1) reproduceerbaar zijn in de tijd. Wanneer een testmethode wordt gebruikt voor indeling in subcategorieën, moet ook de reproduceerbaarheid ten aanzien van die indeling worden aangetoond.

Kwaliteitscontrole (QC)

21. Het RhE-model mag alleen worden gebruikt als de ontwikkelaar/leverancier aantoont dat iedere batch van het gebruikte RhE-model voldoet aan gedefinieerde productievrijgavecriteria, waarvan die voor *levensvatbaarheid* (punt 17), *barrièrefunctie* (punt 18) en *morfologie* (punt 19) de meest relevante zijn. Deze gegevens worden aan de gebruikers van de testmethode verstrekt, zodat zij deze informatie in het testverslag kunnen opnemen. Een betrouwbare voorspelling van corrosieve effecten kan uitsluitend worden gedaan op grond van resultaten verkregen met door de QC goedgekeurde weefselbatches. Door de ontwikkelaar/leverancier van het RhE-model wordt een aanvaardbaarheidsbereik (boven- en ondergrens) voor de IC_{50} of de ET_{50} vastgesteld. In tabel 3 worden de aanvaardbaarheidsbereiken voor de vier gevalideerde testmodellen gegeven.

Tabel 3: QC-criteria voor batchvrijgave

	Ondergrens aanvaardbaarheid	**Bovengrens aanvaardbaarheid**
EpiSkin™ (SM) (SDS-behandeling van 18 uur) (33)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 uur	ET_{50} = 8,7 uur
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET_{50} = 4,0 uur	ET_{50} = 10,0 uur
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET_{50} = 2,0 uur	ET_{50} = 7,0 uur

Het aanbrengen van de teststof en de controlestoffen

22. Er moeten voor elke teststof en controles voor elke blootstellingstijd ten minste twee duploweefsels worden gebruikt. Voor zowel vloeibare als vaste stoffen geldt dat er zo veel teststof moet worden aangebracht dat het epidermisoppervlak gelijkmatig bedekt is, d.w.z. ten minste 70 µl/cm^2 of 30 mg/cm^2 moet worden gebruikt, maar er mag geen oneindige dosis worden gebruikt. Afhankelijk van de modellen moet het epidermisoppervlak voor aanbrenging van vaste chemische stoffen worden bevochtigd met gedeïoniseerd of gedestilleerd water, om voor een goed contact van de teststof met het epidermisoppervlak te zorgen (34) (35) (36) (37). Indien mogelijk moeten vaste stoffen in de vorm van een fijn poeder worden getest. De wijze van aanbrengen moet geschikt zijn voor de teststof (zie bijvoorbeeld referenties 34-37). Aan het eind van de blootstellingsperiode moet de teststof zorgvuldig met een waterige buffer of 0,9 % NaCl van de epidermis worden gewassen. Afhankelijk van welke van de vier gevalideerde RhE-testmodellen wordt gebruikt, worden er twee of drie blootstellingsperioden per teststof gebruikt (voor alle vier de gevalideerde RhE-modellen: 3 min en 1 uur; voor EpiSkin™ een

extra blootstellingstijd van 4 uur). Afhankelijk van het gebruikte RhE-testmodel en de beoordeelde blootstellingstijd, kan de incubatietemperatuur tijdens de blootstelling variëren tussen kamertemperatuur en 37 °C.

23. In elk experiment moeten gelijktijdig uitgevoerde negatieve controles en positieve controles worden gebruikt om aan te tonen dat de levensvatbaarheid (met de negatieve controles), de barrièrefunctie en de resulterende gevoeligheid (met de positieve controles) van de weefsels binnen een gedefinieerd historisch aanvaardbaarheidsbereik liggen. Als positieve controlestoffen worden ijsazijn of 8 N KOH aanbevolen, afhankelijk van het gebruikte RhE-model. Er zij op gewezen dat 8 N KOH een rechtstreeks MTT reducerende stof is, zodat er mogelijk aangepaste controles zoals beschreven in de punten 25 en 26 nodig zijn. Als negatieve controles worden 0,9 % (g/v) NaCl of water aanbevolen.

Metingen van de cellevensvatbaarheid

24. Voor het meten van de cellevensvatbaarheid in het kader van deze testmethode moet de kwantitatieve MTT-test worden gebruikt (27). Het huidmonster wordt 3 uur in een MTT-oplossing met een geschikte concentratie (bv. 0,3 of 1 mg/ml) gelegd. Het neergeslagen blauwe formazanproduct wordt vervolgens met een oplosmiddel (bv. isopropanol, aangezuurde isopropanol) uit het weefsel geëxtraheerd, en de formazanconcentratie wordt bepaald door de OD te meten bij 570 nm, bij een bandbreedte van maximaal ± 30 nm, of door middel van een HPLC/UPLC-spectrofotometrieprocedure (zie de punten 30 en 31) (38).

25. Soms verstoren teststoffen de MTT-test, door rechtstreekse reductie van MTT tot blauw formazan en/of door kleurinterferentie indien de teststof van nature of als gevolg van de behandelingsprocedures in hetzelfde OD-bereik absorbeert als formazan (570 ± 30 nm, vooral blauwe en paarse stoffen). Om mogelijke storing door deze teststoffen te detecteren en ervoor te corrigeren moeten er aanvullende controles worden uitgevoerd, zoals de controle op niet-specifieke MTT-reductie (NSMTT-controle) en de niet-specifieke kleurcontrole (NSC-controle) (zie de punten 26 tot en met 30). Dit is vooral van belang als een bepaalde teststof zich niet volledig van de huid laat wassen, of als de stof in de epidermis penetreert, en de teststof daardoor in de weefsels aanwezig is wanneer de MTT-levensvatbaarheidstest wordt uitgevoerd. Een gedetailleerde beschrijving van hoe voor rechtstreekse MTT-reductie en interferentie door kleurstoffen kan worden gecorrigeerd, is te vinden in de SOP's voor de testmodellen (34) (35) (36) (37).

26. Om rechtstreeks MTT reducerende stoffen te herkennen moet elke teststof worden toegevoegd aan vers bereid MTT-medium (34) (35) (36) (37). Als het MTT-mengsel met de teststof blauw/paars wordt, wordt de teststof als een rechtstreeks MTT reducerende stof beschouwd en moet een verdere functionele toetsing van niet-levensvatbare epidermis worden uitgevoerd, ongeacht of de meting van de standaard extinctie (OD) of een HPLC/UPLC-spectrofotometrieprocedure wordt gebruikt. Bij deze aanvullende functionele toetsing worden gedode weefsels gebruikt die slechts een residuele metabole activiteit vertonen, maar de teststof

wel absorberen in vergelijkbare mate als levensvatbare weefsels. Elke MTT reducerende chemische stof wordt aangebracht op ten minste twee duplo's van gedood weefsel per blootstellingstijd, die vervolgens de gehele huidcorrosietest ondergaan. De werkelijke levensvatbaarheid van het weefsel wordt dan berekend als de procentuele levensvatbaarheid van het weefsel verkregen met levende weefsels die zijn blootgesteld aan de MTT reducerende stof, minus het percentage niet-specifieke MTT-reductie verkregen met de gedode weefsels die aan de zelfde MTT reducerende stof zijn blootgesteld, ten opzichte van de negatieve controle die gelijktijdig met de te corrigeren test is uitgevoerd (%NSMTT).

27. Om na te gaan of gekleurde teststoffen of teststoffen die gekleurd worden wanneer ze in contact komen met water of isopropanol, de test zouden kunnen verstoren en te beslissen of er aanvullende controles nodig zijn, moet een spectrumanalyse van de teststof in water (milieu tijdens blootstelling) en/of isopropanol (extractieoplossing) worden uitgevoerd. Als de teststof in water en/of isopropanol licht absorbeert in het bereik van 570 ± 30 nm, moeten er extra kleurstofcontroles worden uitgevoerd of moet als alternatief een HPLC/UPLC-spectrofotometrieprocedure worden gebruikt, in welk geval deze controles niet nodig zijn (zie de punten 30 en 31). Bij het uitvoeren van de meting van de standaard extinctie (OD) wordt elke verstorende gekleurde teststof op ten minste twee levensvatbare duploweefsels per blootstellingstijd aangebracht, die de hele huidcorrosietest doorlopen maar tijdens de MTT-incubatiestap geïncubeerd worden met medium in plaats van MTT-oplossing om zo tot een niet-specifieke kleurcontrole (NSC_{levend}-controle) te komen. Vanwege de inherente biologische variabiliteit van levende weefsels moet de NSC_{levend}-controle gelijktijdig worden uitgevoerd voor elke blootstellingstijd en voor elke gekleurde teststof (in elke testrun). De werkelijke levensvatbaarheid van het weefsel wordt dan berekend als de procentuele levensvatbaarheid verkregen met levende weefsels die zijn blootgesteld aan de verstorende teststof en geïncubeerd met MTT-oplossing, minus het percentage niet-specifieke kleur verkregen met levende weefsels die zijn blootgesteld aan de verstorende teststof en geïncubeerd met medium zonder MTT, gelijktijdig uitgevoerd met de te corrigeren test (%NSC_{levend}).

28. Voor teststoffen waarvan wordt vastgesteld dat ze zowel rechtstreekse reductie van MTT (zie punt 26) als kleurinterferentie veroorzaken (zie punt 27), is naast de hierboven beschreven NSMTT- en NSC_{levend}-controles nog een derde reeks controles nodig, wanneer de meting van de standaard extinctie (OD) wordt uitgevoerd. Dit geldt doorgaans voor donkergekleurde (bv. blauwe, paarse of zwarte) teststoffen die de MTT-test verstoren, omdat hun intrinsieke kleur de beoordeling van hun vermogen om rechtstreeks MTT te reduceren zoals beschreven in punt 26, belemmert. Deze teststoffen binden mogelijk zowel aan levende als gedode weefsels en daarom corrigeert de NSMTT-controle mogelijk niet alleen voor potentiële rechtstreekse MTT-reductie door de teststof, maar ook voor kleurinterferentie die voortkomt uit de binding van de teststof aan de gedode weefsels. Dit zou kunnen leiden tot een dubbele correctie voor kleurinterferentie, aangezien de NSC_{levend}-controle al voor kleurinterferentie als gevolg van de binding van de teststof aan levende weefsels corrigeert. Om een mogelijke dubbele correctie voor kleurinterferentie te vermijden moet een derde controle voor niet-specifieke kleur in gedode

weefsels (NSC_{gedood}) worden uitgevoerd. In deze extra controle wordt de teststof aangebracht op ten minste twee duplo's van gedood weefsel per blootstellingstijd, die de gehele testprocedure doorlopen maar in de MTT-incubatiestap geïncubeerd worden met medium in plaats van met MTT-oplossing. Per teststof is één NSC_{gedood}-controle voldoende, ongeacht het aantal onafhankelijke tests/testruns dat wordt uitgevoerd, maar deze moet gelijktijdig worden uitgevoerd met de NSMTT-controle en, waar mogelijk, met dezelfde weefselbatch. De werkelijke levensvatbaarheid van het weefsel wordt dan berekend als de procentuele levensvatbaarheid verkregen met levende weefsels die zijn blootgesteld aan de teststof minus %NSMTT minus $\%NSC_{levend}$ plus het percentage niet-specifieke kleur verkregen met gedode weefsels die zijn blootgesteld aan de verstorende teststof en geïncubeerd met medium zonder MTT, ten opzichte van de negatieve controle die gelijktijdig met de te corrigeren test is uitgevoerd ($\%NSC_{gedood}$).

29. Het is van belang op te merken dat niet-specifieke MTT-reductie en niet-specifieke kleurinterferenties ertoe kunnen leiden dat de meetwaarden voor het weefselextract buiten het lineariteitsbereik van de spectrofotometer vallen. Daarom moet elk laboratorium, alvorens te beginnen met het testen van teststoffen met het oog op regelgeving, eerst het lineariteitsbereik van de spectrofotometer bepalen met in de handel verkregen MTT-formazan (CAS-nr. 57360-69-7). meting van de standaard extinctie (OD) met een spectrofotometer is met name geschikt voor de beoordeling van rechtstreeks MTT reducerende stoffen en teststoffen die kleurinterferentie vertonen, als de OD's van de weefselextracten die worden verkregen met de teststof zonder correctie voor rechtstreekse MTT-reductie en/of kleurinterferentie, binnen het lineariteitsbereik van de spectrofotometer vallen of als de ongecorrigeerde procentuele levensvatbaarheid die met de teststof wordt verkregen, deze al als corrosieve chemische stof heeft aangewezen (zie de punten 35 en 36). Niettemin moeten de resultaten voor teststoffen die een %NSMTT en/of een $\%NSC_{levend}$ van > 50 % van de negatieve controle opleveren, met omzichtigheid worden benaderd.

30. Voor gekleurde teststoffen die vanwege een te sterke interferentie met de MTT-test niet compatibel zijn met de meting van de standaard extinctie (OD), kan wellicht de alternatieve HPLC/UPLC-spectrofotometrieprocedure voor het meten van MTT-formazan worden toegepast (zie punt 31) (37). In het HPLC/UPLC-spectrofotometriesysteem kan het MTT-formazan voordat het gekwantificeerd wordt, van de teststof worden gescheiden (38). Daarom zijn er bij gebruik van HPLC/UPLC-spectrofotometrie geen NSC_{levend}- of NSC_{gedood}-controles nodig, ongeacht de geteste chemische stof. Als echter vermoed wordt dat de teststof rechtstreeks MTT reduceert of een kleur heeft die de beoordeling van het vermogen om rechtstreeks MTT te reduceren (zoals beschreven in punt 26) belemmert, moeten er wel NSMTT-controles worden toegepast. Bij gebruik van HPLC/UPLC-spectrofotometrie voor het meten van MTT-formazan wordt de procentuele levensvatbaarheid van het weefsel berekend als percentage van de piekoppervlakte voor MTT-formazan verkregen met levende weefsels die aan de teststof zijn blootgesteld, ten opzichte van de piekoppervlakte voor MTT-formazan verkregen met de gelijktijdige negatieve controle. Voor teststoffen die rechtstreeks MTT kunnen reduceren, wordt

de levensvatbaarheid van het weefsel berekend als de procentuele levensvatbaarheid van het weefsel verkregen met levende weefsels die aan de teststof zijn blootgesteld, minus %NSMTT. Tot slot zij erop gewezen dat rechtstreeks MTT reducerende stoffen die mogelijk ook kleurinterferentie vertonen, als ze na de behandeling in de weefsels achterblijven en MTT zo sterk reduceren dat dit OD's (met standaard OD-meting) of piekoppervlakten (met HPLC/UPLC-spectrofotometrie) oplevert voor de geteste weefselextracten die buiten het lineariteitsbereik van de spectrofotometer vallen, niet beoordeeld kunnen worden, hoewel dergelijke gevallen naar verwachting slechts zeer zelden voorkomen.

31. HPLC/UPLC-spectrofotometrie kan voor alle typen teststoffen (al dan niet gekleurd, al dan niet MTT reducerend) worden gebruikt voor het meten van MTT-formazan (38). Vanwege de diversiteit van HPLC/UPLC-spectrofotometriesystemen moet de deugdelijkheid van het HPLC/UPLC-spectrofotometriesysteem worden aangetoond alvorens het wordt gebruikt voor het kwantificeren van MTT-formazan in weefselextracten, door aan de aanvaardbaarheidscriteria te voldoen voor een reeks standaard deugdelijkheidsparameters op basis van de parameters beschreven in de voor de industrie bestemde leidraad van de Amerikaanse Food and Drug Administration voor de validering van bioanalytische methoden (38) (39). Deze kritische parameters en de bijbehorende aanvaardbaarheidscriteria worden weergegeven in aanhangsel 4. Als aan de in aanhangsel 4 gestelde aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt het HPLC/UPLC-spectrofotometriesysteem als deugdelijk beschouwd en kan het worden gebruikt voor het meten van MTT-formazan onder de experimentele omstandigheden die worden beschreven in deze testmethode.

Aanvaardbaarheidscriteria

32. Voor elke testmethode waarbij gebruikgemaakt wordt van gevalideerde RhE-modellen, moeten weefsels die met de negatieve controle zijn behandeld een OD vertonen die binnen de aanvaardbaarheidsbereiken liggen voor de weefsels zoals beschreven in tabel 2, en mogen deze niet onder historisch vastgestelde ondergrenzen komen. Met de positieve controlestoffen, d.w.z. ijsazijn of 8 N KOH, behandelde weefsels moeten blijk geven van hun vermogen om te reageren op een corrosieve chemische stof onder de omstandigheden van het testmodel (zie aanhangsel 2). De variabiliteit tussen duploweefsels voor de teststof en/of controlestoffen moet binnen de aanvaardbare grenzen voor elk gevalideerde RhE-model liggen (zie aanhangsel 2) (het verschil in levensvatbaarheid tussen de twee duploweefsels mag bijvoorbeeld niet groter zijn dan 30 %). Als de negatieve controle of de positieve controle in een testrun buiten het aanvaarde bereik valt, wordt de testrun als ondeugdelijk beschouwd en moet deze worden overgedaan. Als de variabiliteit van de teststoffen buiten het gegeven bereik valt, moet het testen worden overgedaan.

Interpretatie van de resultaten en voorspellingsmodel

33. De voor elke teststof verkregen OD-waarden moeten worden gebruikt voor de berekening van de procentuele levensvatbaarheid in vergelijking met de negatieve controle, die op 100 % wordt gesteld. Wanneer HPLC/UPLC-spectrofotometrie wordt gebruikt, wordt de procentuele

levensvatbaarheid van het weefsel berekend als percentage van de piekoppervlakte voor MTT-formazan verkregen met levende weefsels die aan de teststof zijn blootgesteld, ten opzichte van de piekoppervlakte voor MTT-formazan verkregen met de gelijktijdige negatieve controle. De drempelwaarden van de procentuele cellevensvatbaarheid die als scheiding fungeren tussen corrosieve en niet-corrosieve teststoffen (of tussen verschillende subcategorieën van corrosiviteit), worden in de onderstaande punten 35 en 36 gespecificeerd voor elk van de testmodellen die door deze testmethode worden bestreken, en moeten worden gebruikt voor de interpretatie van de resultaten.

34. Eén testrun bestaande uit ten minste twee duploweefsels zou voldoende moeten zijn voor een teststof, indien de indeling ervan ondubbelzinnig is. Echter, bij grensgevallen zoals niet-concordante metingen van duplo's, kan een tweede testrun worden overwogen, evenals een derde testrun in geval van niet-concordante resultaten tussen de eerste twee testruns.

35. Het voorspellingsmodel voor het testmodel EpiSkin™ voor huidcorrosie (9) (34) (22) in overeenstemming met het VN-GHS/CLP-classificatiesysteem wordt weergegeven in tabel 4:

Tabel 4: Voorspellingsmodel voor EpiSkin™

Gemeten levensvatbaarheid na blootstellingstijdstippen (t=3, 60 en 240 minuten)	**Te overwegen prognose**
< 35 % na 3 min blootstelling	**Corrosief:** • Optionele subcategorie 1A*
≥ 35 % na 3 min blootstelling **EN** < 35 % na 60 min blootstelling **OF** ≥ 35 % na 60 min blootstelling **EN** < 35 % na 240 min blootstelling	**Corrosief:** • Een combinatie van de optionele subcategorieën 1B-en-1C
≥ 35 % na 240 min blootstelling	**Niet-corrosief**

*) Uit de gegevens die zijn gegenereerd om te beoordelen of de RhE-testmodellen gebruikt kunnen worden voor de indeling in subcategorieën, is gebleken dat zo'n 22 % van de subcategorie 1A-resultaten van het testmodel EpiSkin™ in werkelijkheid subcategorie 1B- of subcategorie 1C-stoffen/mengsels (d.w.z. te strenge indeling) betreffen (zie aanhangsel 3).

36. De voorspellingsmodellen voor de testmodellen voor huidcorrosie EpiDerm™ SCT (10) (23) (35), SkinEthic™ RHE (17) (18) (23) (36) en epiCS® (16) (23) (37) in overeenstemming met het VN-GHS/CLP-classificatiesysteem worden weergegeven in tabel 5:

Tabel 5: EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE en epiCS®

Gemeten levensvatbaarheid na blootstellingstijdstippen (t=3 en 60 minuten)	**Te overwegen prognose**
STAP 1 voor EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE en epiCS®	

< 50 % na 3 min blootstelling	**Corrosief**
≥ 50 % na 3 min blootstelling **EN** < 15 % na 60 min blootstelling	**Corrosief**
≥ 50 % na 3 min blootstelling **EN** ≥ 15 % na 60 min blootstelling	**Niet-corrosief**
STAP 2 voor EpiDerm™ SCT – voor stoffen/mengsels die in stap 1 als Corrosief zijn aangemerkt	
< 25 % na 3 min blootstelling	Optionele subcategorie 1A*
≥ 25 % na 3 min blootstelling	Een combinatie van de optionele subcategorieën 1B
STAP 2 voor SkinEthic™ RHE – voor stoffen/mengsels die in stap 1 als Corrosief zijn aangemerkt	
< 18 % na 3 min blootstelling	Optionele subcategorie 1A*
≥ 18 % na 3 min blootstelling	Een combinatie van de optionele subcategorieën 1B
STAP 2 voor epiCS® – voor stoffen/mengsels die in stap 1 als Corrosief zijn aangemerkt	
< 15 % na 3 min blootstelling	Optionele subcategorie 1A*
≥ 15 % na 3 min blootstelling	Een combinatie van de optionele subcategorieën 1B

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

37. Voor elke test moeten gegevens van individuele duploweefsels (bv. de OD-waarden en de berekende procentuele cellevensvatbaarheid voor elke teststof, met inbegrip van de indeling) in tabelvorm in het verslag worden opgenomen, met vermelding van gegevens uit herhaalde experimenten, indien van toepassing. Bovendien moeten voor elke test de gemiddelden en bereiken voor de levensvatbaarheid en de variatiecoëfficiënten tussen de duploweefsels in het verslag worden opgenomen. Waargenomen interacties met het MTT-reagens door rechtstreeks MTT reducerende stoffen of gekleurde teststoffen moeten voor alle geteste stoffen worden gemeld.

Testverslag

38. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof en controlestoffen:

- stof die uit één component bestaat: chemische identificatiegegevens, zoals IUPAC- of CAS-naam, CAS-nummer, SMILES- of InChI-code, structuurformule, zuiverheid, chemische identiteit van onzuiverheden, indien van toepassing en praktisch haalbaar enz.;

- stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB en mengsel: voor zover mogelijk, karakterisering aan de hand van chemische identiteit (zie hierboven), kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen van de bestanddelen;
- fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water en aanvullende fysisch-chemische eigenschappen, indien relevant;
- bron, partijnummer indien beschikbaar;
- behandeling van de teststof/controlestof voorafgaand aan het testen, indien van toepassing (bv. opwarming, malen);
- stabiliteit van de teststof, uiterste gebruiksdatum, of datum voor heranalyse, indien bekend;
- bewaaromstandigheden.

Het gebruikte RhE-model en -protocol en motivering daarvoor (indien van toepassing)

Testomstandigheden:

- het gebruikte RhE-model (inclusief batchnummer);
- kalibratie-informatie voor de meetapparatuur die voor het kwantificeren van MTT-formazan is gebruikt (bv. een spectrofotometer), golflengte en bandbreedte (indien van toepassing), en lineariteitsbereik van de meetapparatuur;
- een beschrijving van de methode die voor het kwantificeren van MTT-formazan is gebruikt;
- een beschrijving van de kwalificatie van het HPLC/UPLC-spectrofotometriesysteem, indien van toepassing;
- volledige ondersteunende informatie over het specifieke gebruikte huidmodel, met inbegrip van de deugdelijkheid daarvan. Hieronder moet ten minste informatie zijn over:
    - i) levensvatbaarheid;
    - ii) barrièrefunctie;
    - iii) morfologie;
    - iv) reproduceerbaarheid en voorspellend vermogen;
    - v) kwaliteitscontroles (QC) van het model;
- verwijzingen naar historische gegevens over het model. Hieronder moet ten minste informatie zijn over:
- de aanvaardbaarheid van de QC-gegevens met verwijzing naar historische batchgegevens,
- aantoning van bekwaamheid in de toepassing van de testmethode voorafgaand aan routinematig gebruik door middel van het testen van de stoffen voor bekwaamheidstoetsing.

Testprocedure:

- gedetailleerde gegevens over de gebruikte procedure (met inbegrip van de gebruikte procedures voor het wassen na de blootstellingsperiode);
- de gebruikte doses van de teststof en de controlestoffen;
- de duur van de blootstellingsperiode(n) en blootstellingstemperatu(u)r(en);
- indicatie van de controles die zijn gebruikt voor rechtstreeks MTT-reducerende stoffen en/of gekleurde teststoffen, indien van toepassing;
- het aantal gebruikte duploweefsels per teststof en controles (positieve controle, negatieve controle en NSMTT, NSC_{levend} en NSC_{gedood}, indien van toepassing), per blootstellingstijd;
- een beschrijving van de toegepaste beslissingscriteria/het toegepaste voorspellingsmodel op basis van het gebruikte RhE-model;
- een beschrijving van eventuele modificaties van de testprocedure (met inbegrip van procedures voor het wassen).

Aanvaardbaarheidscriteria voor de test en testruns:

- gemiddelden van de positieve en negatieve controles en aanvaardbaarheidsbereiken op basis van historische gegevens;
- aanvaardbare variabiliteit tussen de duploweefsels voor de positieve en negatieve controles;
- aanvaardbare variabiliteit tussen de duploweefsels voor de teststof.

Resultaten:

- een tabel met gegevens voor afzonderlijke teststoffen en controles, voor elke blootstellingsperiode, elke testrun en elke duplometing met inbegrip van OD of MTT-formazan-piekoppervlakte, procentuele levensvatbaarheid van de weefsels, gemiddelde procentuele levensvatbaarheid van de weefsels, verschillen tussen duplo's, standaarddeviaties en/of variatiecoëfficiënten, indien van toepassing;
- indien van toepassing: resultaten van de gebruikte controles voor rechtstreeks MTT reducerende stoffen en/of gekleurde teststoffen, met inbegrip van OD of MTT-formazan-piekoppervlakte, %NSMTT, $\%NSC_{levend}$, $\%NSC_{gedood}$, verschillen tussen duploweefsels, standaarddeviaties en/of variatiecoëfficiënten (indien van toepassing) en het uiteindelijke gecorrigeerde percentage voor de levensvatbaarheid van de weefsels;
- resultaten verkregen met de teststof(fen) en controlestoffen ten opzichte van de vastgestelde aanvaardbaarheidscriteria voor de test en testruns;
- een beschrijving van andere waargenomen effecten;
- de afgeleide indeling met vermelding van het gebruikte voorspellingsmodel/de gehanteerde beslissingscriteria.

Bespreking van de resultaten

Conclusies

LITERATUUR

(1) VN (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, VN New York en Genève. Beschikbaar op: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) Hoofdstuk B.4 van deze bijlage, Acute huidirritatie/corrosie.

(3) Hoofdstuk B.40 van deze bijlage, In-vitrohuidcorrosie.

(4) Hoofdstuk B.65 van deze bijlage, In-vitrohuidcorrosie: testmethode op basis van de membraanbarrière.

(5) Hoofdstuk B.46 van deze bijlage, In-vitrohuidirritatie: testmethode met gereconstrueerde humane epidermis.

(6) OESO (2014). Guidance document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(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., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop *6.ATLA* 23:219-255.

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

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

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

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

(12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological TestMethods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC,USA.

(14) EC-CEVMA (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), gepubliceerd door het raadgevend wetenschappelijk comité van het Europees Centrum voor de validatie van alternatieve methoden (CEVMA) (ESAC10), 3 april 1998.

(15) EC-CEVMA (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, gepubliceerd door het raadgevend wetenschappelijk comité van het CEVMA (ESAC14), 21 maart 2000.

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

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

(18) Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0.5 cm^2 Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379-1385.

(19) EC-CEVMA (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, gepubliceerd door het raadgevend wetenschappelijk comité van het CEVMA (ESAC25), 17 november 2006.

(20) EC-CEVMA (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, gepubliceerd door het raadgevend wetenschappelijk comité van het CEVMA (ESAC30), 12 juni 2009.

(21) OESO (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and

Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 190). Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

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

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

(24) OESO (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(25) OESO (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. . Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

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

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

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

(29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol.in Vitro* 8:889 - 891.

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

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

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

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

(34) EpiSkin™ SOP (December 2011). *INVITTOX* Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.

(35) EpiDerm™ SOP (February 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.

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

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

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

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

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een testmethode, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden uitgevoerd. De betrouwbaarheid wordt beoordeeld door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid (25).

Cellevensvatbaarheid: parameter waarmee de totale activiteit van een celpopulatie wordt weergegeven, bijvoorbeeld als het vermogen van cellulaire mitochondriale dehydrogenasen om de vitale kleurstof MTT (3-[4,5-dimethylthiazool-2-yl]-2,5-difenyltetrazoliumbromide) te reduceren. Deze parameter is, afhankelijk van het gemeten eindpunt en de opzet van de test, gecorreleerd met het totale aantal levende cellen en/of de vitaliteit van de cellen.

Chemische stof: een stof of een mengsel.

Concordantie: dit is een maat voor de prestaties van de testmethode voor testmethoden die een categoriale uitkomst geven en het is één aspect van relevantie. Deze term en de term "nauwkeurigheid" worden soms door elkaar gebruikt; de term wordt gedefinieerd als het percentage van alle geteste chemische stoffen die correct als positief of negatief worden geclassificeerd. De concordantie is sterk afhankelijk van de prevalentie van positieven in de typen teststoffen die worden onderzocht (25).

ET_{50}: kan worden geraamd door vaststelling van de blootstellingstijd die nodig is om de cellevensvatbaarheid met 50 % te doen dalen bij aanbrenging van de ijkstof in een bepaalde, vaste concentratie. Zie ook IC_{50}.

Gevoeligheid: het percentage van alle positieve/actieve chemische stoffen dat door middel van de testmethode correct wordt ingedeeld. Dit is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert en is een belangrijke factor voor de beoordeling van de relevantie van een testmethode (25).

GHS (mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen): een systeem voor de indeling van chemische producten (stoffen en mengsels) op basis van gestandaardiseerde soorten en niveaus van gevaren van fysische aard en gevaren voor de gezondheid en het milieu, en dat de desbetreffende voorlichtingselementen bepaalt, zoals pictogrammen, signaalwoorden, gevarenaanduidingen, voorzorgsmaatregelen en veiligheidsinformatiebladen, waarmee informatie over de schadelijke effecten van de stoffen kenbaar worden gemaakt teneinde mensen (waaronder werkgevers, werknemers, transporteurs, consumenten en spoedhulpverleners) en het milieu te beschermen (1).

HPLC: hogeprestatievloeistofchromatografie.

Huidcorrosie in vivo: het ontstaan van een irreversibele beschadiging van de huid, namelijk

zichtbare necrose door de epidermis heen in de dermis, na het aanbrengen van een teststof gedurende ten hoogste vier uur. Corrosie-reacties worden gekenmerkt door zweren, bloedingen, bloedkorsten en, tegen het eind van de observatieperiode van 14 dagen, ontkleuring door bleking van de huid, gebieden met volledige haaruitval en littekens. Om twijfelachtig letsel te evalueren moet histopathologie worden overwogen.

IATA: Integrated Approach on Testing and Assessment (geïntegreerde test- en beoordelingsbenadering).

IC_{50}: kan worden geraamd door vaststelling van de concentratie waarin een ijkstof de levensvatbaarheid van de weefsels met 50 % doet dalen (IC_{50}) na een vaste blootstellingstijd. Zie ook ET_{50}.

Mengsel: een mengsel of een oplossing bestaande uit twee of meer stoffen waarin deze stoffen geen reactie met elkaar aangaan.

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromide; thiazolylblauw tetrazoliumbromide.

Nauwkeurigheid: de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de testmethode en erkende referentiewaarden. Dit is een maat voor de prestaties van de testmethode en één aspect van relevantie. Deze term en de term "concordantie", waaronder het percentage correcte uitkomsten van een testmethode wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt (25).

Oneindige dosis: hoeveelheid op de epidermis aangebrachte teststof die groter is dan de hoeveelheid die nodig is om het epidermisoppervlak volledig en gelijkmatig te bedekken.

Stof die uit één component bestaat: een stof die wordt gekenmerkt door haar kwantitatieve samenstelling en waarin een hoofdcomponent aanwezig is in een concentratie van ten minste 80 % (w/w).

Stof die uit meerdere componenten bestaat: een stof die wordt gekenmerkt door haar kwantitatieve samenstelling en waarin meer dan één hoofdcomponent aanwezig is in een concentratie van > 10 % (w/w) en < 80 % (w/w). Een stof die uit meerdere componenten bestaat, is het resultaat van een fabricageproces. Het verschil tussen mengsels en stoffen die uit meerdere componenten bestaan, is dat mengsels worden verkregen door twee of meer stoffen zonder chemische reactie met elkaar te vermengen. Een stof die uit meerdere componenten bestaat, is het resultaat van een chemische reactie.

NC: niet-corrosief.

NSC_{gedood}-controle: niet-specifieke kleurcontrole op gedode weefsels.

NSC_{levend}-controle: niet-specifieke kleurcontrole op levende weefsels.

NSMTT: niet-specifieke MTT-reductie.

OD: optische dichtheid.

PC: positieve controle, een monster met alle bestanddelen van een testsysteem dat met een chemische stof behandeld werd waarvan bekend is dat deze een positieve respons opwekt. Om te verzekeren dat variabiliteit in de positievecontrolerespons doorheen de tijd kan worden beoordeeld, mag de grootte van de positieve respons niet buitensporig zijn.

Prestatienormen: normen, gebaseerd op een gevalideerde testmethode, die de basis vormen voor de beoordeling van de vergelijkbaarheid van een voorgestelde, in mechanistisch en functioneel opzicht gelijksoortige testmethode. Hieronder begrepen zijn: i) essentiële componenten van de testmethode; ii) een minimumlijst van referentiestoffen die zijn gekozen uit de stoffen die zijn gebruikt om de aanvaardbare prestaties van de gevalideerde testmethode aan te tonen; en iii) de soortgelijke betrouwbaarheids- en nauwkeurigheidsniveaus die door de voorgestelde testmethode moeten worden gehaald wanneer ze worden beoordeeld aan de hand van de minimumlijst van referentiestoffen; deze waarden zijn gebaseerd op de waarden die voor de gevalideerde testmethode zijn verkregen (25).

Relevantie: beschrijving van het verband van de testmethode met het te onderzoeken effect en of de test betekenis heeft en nuttig is voor een bepaald doel. Het is de mate waarin de testmethode het te onderzoeken biologische effect correct meet of voorspelt. Relevantie omvat een beoordeling van de nauwkeurigheid (concordantie) van een testmethode (25).

Specificiteit: het percentage van alle negatieve/niet-actieve chemische stoffen dat door middel van de testmethode correct wordt ingedeeld. Dit is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert en is een belangrijke factor voor de beoordeling van de relevantie van een testmethode (25).

Stof: een chemisch element en de verbindingen ervan, zoals zij voorkomen in natuurlijke toestand of bij de productie ontstaan, met inbegrip van alle additieven die nodig zijn voor het behoud van de stabiliteit ervan en alle onzuiverheden ten gevolge van het toegepaste procedé, doch met uitzondering van elk oplosmiddel dat kan worden afgescheiden zonder aantasting van de stabiliteit van de stof of wijziging van de samenstelling ervan. **Teststof:** alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

Testrun: een testrun bestaat uit een of meer teststoffen die gelijktijdig worden getest met een negatieve en een positieve controle.

UPLC: ultrahogeprestatievloeistofchromatografie.

UVCB: stoffen met een onbekende of variabele samenstelling, complexe reactieproducten en biologische materialen.

Aanhangsel 2

BELANGRIJKSTE SPECIFICATIES VAN DE RHE-TESTMODELLEN DIE ZIJN GEVALIDEERD VOOR HET TESTEN VAN HUIDCORROSIE

Specificaties van de testmodellen	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Oppervlak van het model	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Aantal duploweefsels	ten minste 2 per blootstellingstijd	2-3 per blootstellingstijd	ten minste 2 per blootstellingstijd	ten minste 2 per blootstellingstijd
Doses van de behandeling en wijze van aanbrengen	Vloeistoffen en viskeuze stoffen: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm^2) Vaste stoffen: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 µl ± 5 µl NaCl-oplossing (9 g/l) Wassen/klevende stoffen: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) met nylongaas	Vloeistoffen: 50 µl (79,4 µl/cm^2) met of zonder nylongaas *Test vooraf of de teststof compatibel is met nylongaas* Halfvaste stoffen: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Vaste stoffen: 25 µl H_2O (of meer indien nodig) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Wassen: plat "schijfje" van ca. 8 mm	Vloeistoffen en viskeuze stoffen: 40 µl ± 3 µl (80 µl/cm^2) met nylongaas *Test vooraf of de teststof compatibel is met nylongaas* Vaste stoffen: 20 µl ± 2 µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Wassen/klevende stoffen: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) met nylongaas	Vloeistoffen: 50 µl (83,3 µl/cm^2) met nylongaas *Test vooraf of de teststof compatibel is met nylongaas* Halfvaste stoffen: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Vaste stoffen: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (of meer indien nodig) Wassen: plat "schijfje" van ca. 8 mm

Specificaties van de testmodellen	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
		doorsnede op het weefsel dat is bevochtigd met 15 µl H_2O.		doorsnede op het weefsel dat is bevochtigd met 15 µl H_2O.
Voorafgaande toetsing op rechtstreekse MTT-reductie	50 µl (vloeistof) of 20 mg (vaste stof) + 2 ml MTT 0,3 mg/ml oplossing gedurende 180 ± 5 min bij 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → als de oplossing blauw/paars wordt, moeten er aangepaste controles met in water gedode weefsels worden uitgevoerd	50 µl (vloeistof) of 25 mg (vaste stof) + 1 ml MTT 1 mg/ml oplossing gedurende 60 min bij 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → als de oplossing blauw/paars wordt, moeten er aangepaste controles met door bevriezing gedode weefsels worden uitgevoerd	40 µl (vloeistof) of 20 mg (vaste stof) + 1 ml MTT 1 mg/ml oplossing gedurende 180 ± 15 min bij 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → als de oplossing blauw/paars wordt, moeten er aangepaste controles met door bevriezing gedode weefsels worden uitgevoerd	50 µl (vloeistof) of 25 mg (vaste stof) + 1 ml MTT 1 mg/ml oplossing gedurende 60 min bij 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → als de oplossing blauw/paars wordt, moeten er aangepaste controles met door bevriezing gedode weefsels worden uitgevoerd
Voorafgaande toetsing op kleur-interferentie	10 µl (vloeistof) of 10 mg (vaste stof) + 90 µl H_2O gemengd gedurende 15 min bij RT → als de oplossing gekleurd wordt, moeten er aangepaste controles met levende weefsels worden uitgevoerd	50 µl (vloeistof) of 25 mg (vaste stof) + 300 µl H_2O gedurende 60 min bij 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → als de oplossing gekleurd wordt, moeten er aangepaste controles met levende weefsels worden uitgevoerd	40 µl (vloeistof) of 20 mg (vaste stof) + 300 µl H_2O gemengd gedurende 60 min bij kamertemp. → als de teststof gekleurd is, moeten er aangepaste controles met levende weefsels worden uitgevoerd	50 µl (vloeistof) of 25 mg (vaste stof) + 300 µl H_2O gedurende 60 min bij 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → als de oplossing gekleurd wordt, moeten er aangepaste controles met levende weefsels worden uitgevoerd
Blootstellings-tijd en -temperatuur	3 min, 60 min (± 5 min) en 240 min (± 10 min) in zuurkast bij kamertemperatuur (18-28 °C)	3 min bij kamertemp., en 60 min bij 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min bij kamertemp., en 60 min bij 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min bij kamertemp., en 60 min bij 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH

Specificaties van de testmodellen	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Wassen	25 ml 1x PBS (met fosfaat gebufferde fysiologische zoutoplossing) (PBS) (2 ml/keer)	20 keer met constante zachte straal van 1x PBS	20 keer met constante zachte straal van 1x PBS	20 keer met constante zachte straal van 1x PBS
Negatieve controle	50 µl NaCl-oplossing (9 g/l) Getest bij elke blootstellingstijd	50 µl H_2O Getest bij elke blootstellingstijd	40 µl H_2O Getest bij elke blootstellingstijd	50 µl H_2O Getest bij elke blootstellingstijd
Positieve controle	50 µl ijsazijn Slechts 4 uur lang getest	50 µl 8 N KOH Getest bij elke blootstellingstijd	40 µl 8 N KOH Slechts 1 uur lang getest	50 µl 8 N KOH Getest bij elke blootstellingstijd
MTT-oplossing	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT-incubatieduur en -temperatuur	180 min (± 15 min) bij 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min bij 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min (± 15 min) bij 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min bij 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH
Extractie-vloeistof	500 µl aangezuurde isopropanol (0,04 N HCl in isopropanol) (volledige onderdompeling geïsoleerd weefsel)	2 ml isopropanol (extractie van boven- en onderkant van inzetstuk)	1,5 ml isopropanol (extractie van boven- en onderkant van inzetstuk)	2 ml isopropanol (extractie van boven- en onderkant van inzetstuk)
Extractieduur en -temperatuur	Gedurende een nacht bij kamertemp., beschermd tegen licht	Gedurende een nacht niet geroerd bij kamertemp. of gedurende 120 min onder roeren (~120 rpm) bij kamertemp.	Gedurende een nacht niet geroerd bij kamertemp. of gedurende 120 min onder roeren (~120 rpm) bij kamertemp.	Gedurende een nacht niet geroerd bij kamertemp. of gedurende 120 min onder roeren (~120 rpm) bij kamertemp.

Specificaties van de testmodellen	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
OD-meting	570 nm (545 - 595 nm) zonder referentiefilter	570 nm (of 540 nm) zonder referentiefilter	570 nm (540 - 600 nm) zonder referentiefilter	540 - 570 nm zonder referentiefilter
Weefsel-kwaliteits-controle	SDS-behandeling van 18 uur 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	Behandeling met 1 % Triton X-100 4,08 uur ≤ ET_{50} ≤ 8,7 uur	Behandeling met 1 % Triton X-100 4,0 uur ≤ ET_{50} ≤ 10,0 uur	Behandeling met 1 % Triton X-100 2,0 uur ≤ ET_{50} ≤ 7,0 uur
Aanvaardbaar-heidscriteria	1. De gemiddelde OD van de duploweefsels behandeld met de negatieve controle (NaCl) moet voor elke blootstellingstijd ≥ 0,6 en ≤ 1,5 zijn 2. De gemiddelde levensvatbaarheid van de duploweefsels die gedurende 4 uur zijn blootgesteld aan de positieve controle (ijsazijn), uitgedrukt als % van de negatieve controle, moet ≤ 20 % zijn 3. In het bereik van 20-100 % levensvatbaarheid en voor OD's ≥ 0,3 mag het verschil in levensvatbaarheid tussen twee duploweefsels niet groter zijn dan 30 %.	1. De gemiddelde OD van de duploweefsels behandeld met de negatieve controle (H_2O) moet voor elke blootstellingstijd ≥ 0,8 en ≤ 2,8 zijn 2. De gemiddelde levensvatbaarheid van de duploweefsels die gedurende 1 uur zijn blootgesteld aan de positieve controle (8 N KOH), uitgedrukt als % van de negatieve controle, moet < 15 % zijn 3. In het bereik van 20 - 100 % levensvatbaarheid moet de variatiecoëfficiënt (CV) tussen de duploweefsels ≤ 30 % zijn	1. De gemiddelde OD van de duploweefsels behandeld met de negatieve controle (H_2O) moet voor elke blootstellingstijd ≥ 0,8 en ≤ 3,0 zijn 2. De gemiddelde levensvatbaarheid van de duploweefsels die gedurende 1 uur (en 4 uur indien van toepassing) zijn blootgesteld aan de positieve controle (8 N KOH), uitgedrukt als % van de negatieve controle, moet < 15 % zijn 3. In het bereik van 20-100 % levensvatbaarheid en voor OD's ≥ 0,3 mag het verschil in levensvatbaarheid tussen twee duploweefsels niet groter zijn dan 30 %	1. De gemiddelde OD van de duploweefsels behandeld met de negatieve controle (H_2O) moet voor elke blootstellingstijd ≥ 0,8 en ≤ 2,8 zijn 2. De gemiddelde levensvatbaarheid van de duploweefsels die gedurende 1 uur zijn blootgesteld aan de positieve controle (8 N KOH), uitgedrukt als % van de negatieve controle, moet < 20 % zijn 3. In het bereik van 20-100 % levensvatbaarheid en voor OD's ≥ 0,3 mag het verschil in levensvatbaarheid tussen twee duploweefsels niet groter zijn dan 30 %

Aanhangsel 3

PRESTATIES VAN DE TESTMODELLEN VOOR INDELING IN SUBCATEGORIEËN

In de onderstaande tabel zijn de prestaties weergegeven van de vier testmodellen berekend op basis van een set van 80 door de vier testontwikkelaars geteste chemische stoffen. De berekeningen werden uitgevoerd door het secretariaat van de OESO en vervolgens beoordeeld en goedgekeurd door een subgroep van deskundigen (21) (23).

De testmodellen EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ en epiCS® kunnen gebruikt worden voor indeling in subcategorieën (d.w.z. 1A versus 1B-en-1C versus NC)

De prestaties, percentages overclassificering (te strenge indeling) en onderclassificering (onvoldoende strenge indeling), en nauwkeurigheid (voorspellingskracht) van de vier testmodellen op basis van een set van 80 chemische stoffen die alle in 2 of 3 testruns werden getest voor elk testmodel:

STATISTIEKEN OVER DE PROGNOSES VOOR DE GEHELE SET VAN CHEMISCHE STOFFEN

(n= 80 chemische stoffen, getest in 2 onafhankelijke testruns voor epiCS® of 3 onafhankelijke testruns voor EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ en SkinEthic™ RHE, d.w.z. respectievelijk 159* of 240 indelingen)

* vanwege gebrek aan beschikbaarheid werd één chemische stof slechts eenmaal getest met epiCS® (23)

	EpiSkin™	EpiDerm ™	SkinEthic™	epiCS®
Overgeclassificeerd:				
1B-en-1C overgeclassificeerd als 1A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
NC overgeclassificeerd als 1B-en-1C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
NC overgeclassificeerd als 1A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
overgeclassificeerd als Corrosief	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Totaal percentage overgeclassificeerd (alle categorieën)	**17,9 %**	**23,3 %**	**24,5 %**	**25,8 %**
Ondergeclassificeerd:				
1A ondergeclassificeerd als 1B-en-1C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A ondergeclassificeerd als NC	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B-en-1C ondergeclassificeerd als NC	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Totaal percentage ondergeclassificeerd (alle	**3,3 %**	**2,5 %**	**5,4 %**	**4,4 %**

Correct ingedeeld:				
1A correct ingedeeld	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
1B-en-1C correct ingedeeld	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
NC correct ingedeeld	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Algemene nauwkeurigheid	**78,8 %**	**74,2 %**	**70 %**	**69,8 %**

NC: niet-corrosief

Aanhangsel 4

Kritische parameters en aanvaardbaarheidscriteria voor kwalificaties van een HPLC/UPLC-spectrofotometriesysteem voor meting van uit RhE-weefsel geëxtraheerd MTT-formazan

Parameter	Protocol ontleend aan FDA-leidraad (37) (38)	Aanvaardbaarheidscriteria
Selectiviteit	Analyse van isopropanol, levende blanco (isopropanolextract van onbehandelde levende RhE-weefsels), dode blanco (isopropanolextract van onbehandelde gedode RhE-weefsels)	$Oppervlakte_{interferentie} \leq 20\ \%$ van $Oppervlakte_{LLOQ}$[1]
Precisie	Kwaliteitscontroles (d.w.z. MTT-formazan bij 1,6 µg/ml, 16 µg/ml en 160 µg/ml) in isopropanol (n=5)	CV $\leq 15\ \%$ of $\leq 20\ \%$ voor de LLOQ
Nauwkeurigheid	Kwaliteitscontroles in isopropanol (n=5)	%Afw. $\leq 15\ \%$ of $\leq 20\ \%$ voor de LLOQ
Matrixeffect	Kwaliteitscontroles in levende blanco (n=5)	$85\ \% \leq$ percentage matrixeffect $\leq 115\ \%$
Carry-over	Analyse van isopropanol na een ULOQ[2]-standaard	$Oppervlakte_{interferentie} \leq 20\ \%$ van $Oppervlakte_{LLOQ}$
Reproduceerbaarheid (binnen één dag)	3 onafhankelijke kalibratiecurven (op basis van 6 achtereenvolgende 1/3 verdunningen van MTT-formazan in isopropanol beginnend bij de ULOQ, d.w.z. 200 µg/ml); Kwaliteitscontroles in isopropanol (n=5)	Kalibratiecurven: %Afw. $\leq 15\ \%$ of $\leq 20\ \%$ voor de LLOQ Kwaliteitscontroles: %Afw. $\leq 15\ \%$ en CV $\leq 15\ \%$
Reproduceerbaarheid (van dag tot dag)	Dag 1: 1 kalibratiecurve en kwaliteitscontroles in isopropanol (n=3) Dag 2: 1 kalibratiecurve en kwaliteitscontroles in isopropanol (n=3) Dag 3: 1 kalibratiecurve en kwaliteitscontroles in isopropanol (n=3)	
Kortetermijnstabiliteit van MTT-formazan in RhE-weefselextract	Kwaliteitscontroles op levende blanco (n=3) geanalyseerd op de dag van bereiding en na 24 uur bewaring bij kamertemperatuur	%Afw. $\leq 15\ \%$
Langetermijnstabiliteit van MTT-formazan in RhE-weefselextract, indien nodig	Kwaliteitscontroles op levende blanco (n=3) geanalyseerd op de dag van bereiding en na meerdere dagen bewaring bij een gespecificeerde temperatuur (bv. 4 °C, -20 °C, -80 °C)	%Afw. $\leq 15\ \%$

[1]LLOQ: onderste bepaalbaarheidsgrens (Lower Limit of Quantification), gedefinieerd als overeenkomend met 1-2 % levensvatbaarheid van het weefsel, d.w.z. 0,8 µg/ml.

[2]ULOQ: bovenste bepaalbaarheidsgrens (Upper Limit of Quantification), gedefinieerd als ten minste tweemaal zo hoog als de hoogste verwachte MTT-formazanconcentratie in isopropanolextracten van negatieve controles, d.w.z. 200 µg/ml."

7) In deel B wordt hoofdstuk B.46 vervangen door:

"B.46. IN-VITROHUIDIRRITATIE: TESTMETHODE MET GERECONSTRUEERDE HUMANE EPIDERMIS

INLEIDING

1. Deze testmethode (TM) is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 439 (2015) van de OESO. Onder huidirritatie wordt verstaan: het ontstaan van reversibele schade aan de huid na het aanbrengen van een teststof gedurende maximaal 4 uur (zoals gedefinieerd door het mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, GHS) van de Verenigde Naties (VN) (1) en Verordening (EU) nr. 1272/2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels (CLP-verordening)1. Deze testmethode bevat een in-vitroprocedure die gebruikt kan worden om de gevaren van irriterende chemische stoffen (stoffen en mengsels) te identificeren in overeenstemming met VN-GHS/CLP-categorie 2 (2). In regio's die niet de optionele VN-GHS-categorie 3 (licht irriterende stoffen) hebben aangenomen, kan deze testmethode ook worden gebruikt om niet-ingedeelde chemische stoffen te identificeren. Afhankelijk van het regelgevend kader en het gebruikte classificatiesysteem kan deze testmethode worden gebruikt om de door chemische stoffen veroorzaakte huidirritatie te bepalen als een zelfstandige vervangende test voor in-vivohuidirritatietests of als een gedeeltelijk vervangende test binnen een teststrategie (3).

2. De bepaling van de huidirritatie ging meestal gepaard met het gebruik van proefdieren [TM B.4, gelijkwaardig aan OESO TG 404; oorspronkelijk vastgesteld in 1981, herzien in 1992, 2002, 2015] (4). Voor het testen op corrosiviteit zijn drie gevalideerde in-vitrotestmethoden goedgekeurd als OESO TM B.40 (gelijkwaardig aan OESO TG 430), TM B.40 bis (gelijkwaardig aan OESO TG 431) en TM B.65 (gelijkwaardig aan OESO TG 435) (5) (6) (7). In een OESO-leidraad voor een geïntegreerde test- en beoordelingsbenadering (Integrated Approach on Testing and Assessment, IATA) voor huidcorrosie en -irritatie worden verschillende modules beschreven met gedeelde informatiebronnen en analyse-instrumenten. De IATA i) biedt richtsnoeren voor de integratie en het gebruik van bestaande gegevens die zijn verzameld met behulp van test-

[1] Verordening (EG) nr. 1272/2008 van het Europees Parlement en de Raad van 16 december 2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels, tot wijziging en intrekking van de Richtlijnen 67/548/EEG en 1999/45/EG en tot wijziging van Verordening (EG) nr. 1907/2006, PB L 353 van 31.12.2008, blz. 1.

en niet-testmethoden om het potentieel voor huidirritatie en -corrosie van chemische stoffen te beoordelen en ii) draagt een benadering aan voor wanneer verder testen nodig is (3).

3. Deze testmethode heeft betrekking op huidirritatie als eindpunt voor de menselijke gezondheid. De testmethode is gebaseerd op het in-vitrotestsysteem van gereconstrueerde humane epidermis (RhE), dat nauwe overeenkomsten heeft met de biochemische en fysiologische eigenschappen van de bovenste delen van de menselijke huid, d.w.z. de epidermis. Voor het RhE-testsysteem worden uit mensen verkregen niet-getransformeerde keratinocyten als celbron gebruikt om een epidermismodel te reconstrueren met een representatieve histologie en cytoarchitectuur. Er zijn prestatienormen beschikbaar voor de validering en beoordeling van soortgelijke en gewijzigde op RhE gebaseerde testmethoden, in overeenstemming met de beginselen van OESO-richtsnoer nr. 34 (8) (9). De overeenkomstige testrichtlijn werd oorspronkelijk vastgesteld in 2010, bijgewerkt in 2013 met meer RhE-modellen en bijgewerkt in 2015 met verwijzingen naar de IATA-leidraad en de toevoeging van een alternatieve procedure die kan worden gebruikt om de levensvatbaarheid te meten.

4. Er zijn prevaliderings-, optimaliserings- en valideringsstudies afgerond voor vier in de handel verkrijgbare in-vitrotestmodellen (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) op basis van het RhE-testsysteem (gevoeligheid 80 %, specificiteit 70 % en nauwkeurigheid 75 %). Deze vier testmodellen zijn in deze testrichtlijn opgenomen. Aanhangsel 2 bevat een overzicht ervan, alsmede informatie over het soort valideringsstudie dat voor de validering van de verschillende testmethoden is gebruikt. Zoals opgemerkt in aanhangsel 2 is voor de ontwikkeling van deze testmethode en de prestatienormen gebruikgemaakt van de gevalideerde referentiemethode (Validated Reference Method, VRM) (8).

5. De wederzijdse aanvaarding van gegevens in overeenstemming met de OESO-overeenkomst is enkel gewaarborgd voor testmodellen die zijn gevalideerd volgens de prestatienormen (8), voor zover die testmodellen door de OESO zijn geëvalueerd en goedgekeurd. De in deze testmethode en de overeenkomstige OESO-testrichtlijn opgenomen testmodellen kunnen zonder onderscheid worden gebruikt om te voldoen aan de eisen die aan landen worden gesteld wat betreft de testresultaten van in-vitrotestmethoden voor huidirritatie, en in aanmerking te komen voor wederzijdse aanvaarding van gegevens.

6. Definities van in dit document gebruikte termen worden gegeven in aanhangsel 1.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

7. Zoals de volledige prospectieve valideringsstudie ter beoordeling en karakterisering van RhE-testmethoden (16) aantoont, bevat de testmethode de beperking dat de chemische stoffen niet kunnen worden ingedeeld in de optionele VN- GHS-categorie 3 (licht irriterende stoffen) (1). Hoe deze testmethode wordt gebruikt, zal dan ook worden beslist door de OESO-landen in het desbetreffende regelgevingskader. Voor de EU is categorie 3 niet opgenomen in de CLP-verordening. Voor een volledige beoordeling van lokale huideffecten na één blootstelling op de huid moet de OESO-leidraad voor een geïntegreerde test- en beoordelingsbenadering (Integrated Approach on Testing and Assessment, IATA) worden geraadpleegd (3). Voor het gebruik van menselijke huid gelden nationale en internationale ethische overwegingen en voorwaarden.

8. Deze testmethode heeft betrekking op huidirritatie als eindpunt voor de menselijke gezondheid. Hoewel deze testmethode geen toereikende informatie over huidcorrosie oplevert, moet worden opgemerkt dat TM B.40 bis (gelijkwaardig aan OESO TG 431) betreffende huidcorrosie gebaseerd is op hetzelfde RhE-testsysteem, maar met gebruikmaking van een ander protocol (6). Deze testmethode is gebaseerd op RhE-modellen die gebruikmaken van menselijke keratinocyten, die derhalve in vitro het doelorgaan van het te onderzoeken bestanddeel vertegenwoordigen. Bovendien heeft de methode direct betrekking op de eerste fase van de inflammatoire reactie/het werkingsmechanisme (cel- en weefselbeschadiging leidend tot plaatselijk trauma) die tijdens irritatie in vivo plaatsvindt. Bij de onderliggende validering van deze testmethode werd een groot aantal chemische stoffen getest. De databank van de valideringsstudie bevatte in totaal 58 chemische stoffen (16) (18) (23). De testmethode is van toepassing op vaste stoffen, vloeibare stoffen, halfvaste stoffen en wassen. Vloeistoffen mogen waterig of niet-waterig zijn; vaste stoffen mogen al dan niet in water oplosbaar zijn. Waar mogelijk moeten vaste stoffen tot een fijn poeder worden vermalen voordat ze worden aangebracht; verdere voorbehandeling van het monster is niet nodig. Gassen en aerosolen zijn nog niet gevalideerd in een valideringsstudie (29). Hoewel het denkbaar is dat deze met behulp van RhE-technologie kunnen worden getest, staat de huidige testmethode het testen van gassen en aerosolen niet toe.

9. Voordat de testmethode wordt gebruikt op een mengsel om gegevens te genereren voor een beoogd regelgevingsdoel, moet worden nagegaan of, en zo ja, waarom deze methode betrouwbare resultaten oplevert voor dat doel. Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is. Mengsels vertegenwoordigen evenwel een breed spectrum aan categorieën en samenstellingen en er is vooralsnog slechts beperkte informatie over het testen van mengsels beschikbaar. Wanneer kan worden aangetoond dat de testmethode niet op een specifieke categorie van mengsels kan worden toegepast (bv. aan de hand van een strategie zoals voorgesteld in Eskes *et al.*, 2012) (30), mag de testmethode dan ook niet voor die specifieke categorie van mengsels worden gebruikt.

Evenzeer moet voorzichtigheid worden betracht wanneer bepaalde chemische klassen of fysisch-chemische eigenschappen niet geschikt blijken te zijn voor de huidige testmethode.

10. Teststoffen die licht absorberen in hetzelfde bereik als MTT-formazan, en teststoffen die de vitale kleurstof MTT rechtstreeks kunnen reduceren (tot MTT formazan), kunnen de metingen van de cellevensvatbaarheid verstoren, zodat het bij deze stoffen nodig is om aangepaste controles te gebruiken met het oog op correcties (zie punten 28-34).

11. Eén test bestaande uit drie gerepliceerde weefsels zou voldoende moeten zijn voor een teststof, indien de indeling ervan ondubbelzinnig is. Echter, bij grensgevallen zoals niet-concordante metingen van duplo's en/of een gemiddelde procentuele levensvatbaarheid van 50 ± 5 %, moet een tweede testrun worden overwogen, evenals een derde testrun in geval van niet-concordante resultaten tussen de eerste twee testruns.

PRINCIPE VAN DE TEST

12. De teststof wordt plaatselijk aangebracht op een driedimensionaal RhE-model dat bestaat uit niet-getransformeerde, uit mensen verkregen epidermiskeratinocyten, die gekweekt zijn om een meerlagig, hooggedifferentieerd model van de menselijke epidermis te vormen. Het model bestaat uit een georganiseerd stratum basale, stratum spinosum en stratum granulosum, en een meerlagig stratum corneum, die intercellulaire lamelvormige lipidelagen bevatten die representatief zijn voor de belangrijkste lipideklassen, analoog aan die in vivo worden aangetroffen.

13. Door chemische stoffen geïnduceerde huidirritatie, die zich voornamelijk manifesteert als erytheem en oedeem, is het gevolg van een cascade van gebeurtenissen, beginnend met de penetratie van de chemische stoffen door het stratum corneum waar ze de onderliggende keratinocytlagen en andere huidcellen kunnen beschadigen. De beschadigde cellen kunnen ontstekingsmediatoren afgeven of een inflammatoire cascade veroorzaken die ook inwerkt op de cellen in de dermis, in het bijzonder de stroma- en endotheliale cellen van de bloedvaten. Door de dilatatie en verhoogde permeabiliteit van de endotheliale cellen ontstaan het waargenomen erytheem en oedeem (29). Opgemerkt moet worden dat de op RhE gebaseerde testmodellen, bij gebrek aan vascularisatie in het in-vitrotestsysteem, de initiërende gebeurtenissen in de cascade, bv. cel-/weefselbeschadiging (16) (17), meten met de cellevensvatbaarheid als meetwaarde.

14. De cellevensvatbaarheid in RhE-modellen wordt gemeten door enzymatische omzetting van de vitale kleurstof MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromide, thiazolylblauw; CAS-nummer 298-93-1] in een blauw formazanzout dat kwantitatief wordt gemeten na extractie uit weefsels (31). Irriterende chemische stoffen worden geïdentificeerd op hun vermogen om de cellevensvatbaarheid te reduceren tot minder dan gedefinieerde drempelwaarden (d.w.z. ≤ 50 %, voor VN-GHS/CLP-categorie 2).

Afhankelijk van het regelgevend kader en de toepasbaarheid van de testmethode, kunnen chemische stoffen die leiden tot een levensvatbaarheid van cellen van meer dan de gedefinieerde grenswaarde, beschouwd worden als niet-irriterende stoffen (d.w.z. > 50 %, geen categorie).

AANTONING VAN BEKWAAMHEID

15. Voordat de vier gevalideerde testmodellen die aan deze testmethode voldoen (aanhangsel 2), routinematig worden gebruikt, moeten laboratoria hun technische bekwaamheid aantonen aan de hand van de tien in tabel 1 vermelde stoffen voor bekwaamheidstoetsing. Wanneer een stof uit de lijst bijvoorbeeld niet beschikbaar is, kan een andere stof waarvoor voldoende in-vivo- en in-vitroreferentiegegevens beschikbaar zijn, worden gebruikt (bv. uit de lijst met referentiestoffen (8)), mits dezelfde selectiecriteria als in tabel 1 worden toegepast. Het gebruik van een alternatieve stof voor bekwaamheidstoetsing moet worden gerechtvaardigd.

16. Als onderdeel van deze bekwaamheidstoetsing wordt aanbevolen dat de gebruikers na ontvangst de door de fabrikant van het RhE-model gespecificeerde barrière-eigenschappen van de weefsels verifiëren. Dit is in het bijzonder van belang indien weefsels over lange afstanden/gedurende lange perioden zijn vervoerd. Zodra een testmethode met succes is opgezet en de bekwaamheid in het gebruik ervan is verworven en aangetoond, behoeft een dergelijke verificatie niet routinematig te worden uitgevoerd. Echter, indien een testmethode routinematig wordt gebruikt, wordt aanbevolen om de barrière-eigenschappen op regelmatige basis te blijven toetsen.

Tabel 1: Stoffen voor bekwaamheidstoetsing[1]

Stof	**CAS-nr.**	**In-vivoscore[2]**	**Fysische toestand**	**VN-GHS-categorie**
NIET-INGEDEELDE STOFFEN (VN-GHS Geen categorie)				
naftaleenazijnzuur	86-87-3	0	Vaste stof	Geen cat.
isopropanol	67-63-0	0,3	Vloeistof	Geen cat.
methylstearaat	112-61-8	1	Vaste stof	Geen cat.
heptylbutyraat	5870-93-9	1,7	Vloeistof	Geen cat. *(optionele cat. 3)*[3]
hexylsalicylaat	6259-76-3	2	Vloeistof	Geen cat. *(optionele cat. 3)*[3]
INGEDEELDE STOFFEN (VN-GHS-categorie 2)				
cyclamenaldehyde	103-95-7	2,3	Vloeistof	Cat. 2
1-broomhexaan	111-25-1	2,7	Vloeistof	Cat. 2
kaliumhydroxide (5 % water)	1310-58-3	3	Vloeistof	Cat. 2
1-methyl-3-fenyl-1-piperazine	5271-27-2	3,3	Vaste stof	Cat. 2
heptanal	111-71-7	3,4	Vloeistof	Cat. 2

[1] De stoffen voor bekwaamheidstoetsing vormen een subset van de stoffen die zijn gebruikt in de valideringsstudie en de selectie is gebaseerd op de volgende criteria: i) de chemische stoffen zijn in de handel verkrijgbaar; ii) ze bestrijken het volledige bereik van Draize-irritatiescores (van niet-irriterend tot sterk irriterend); iii) de chemische structuur van de stoffen is goed omschreven; iv) ze zijn representatief voor de chemische functionaliteit die in het valideringsproces is gebruikt; v) ze hebben reproduceerbare in-vitroresultaten opgeleverd in meerdere testen en meerdere laboratoria; vi) de prognoses in vitro voor deze stoffen zijn correct gebleken, en vii) ze kennen geen extreem toxisch profiel (bv. carcinogeen of toxisch voor het voortplantingssysteem) en er zijn ook geen buitensporige verwijderingskosten aan verbonden.

[2] In-vivoscore overeenkomstig TM B.4 (4).

[3] Bij deze testmethode wordt de optionele VN-GHS-categorie 3 (licht irriterende stoffen) (1) beschouwd als Geen categorie.

PROCEDURE

17. Het onderstaande is een beschrijving van de componenten en procedures van een RhE-testmethode voor beoordeling van huidirritatie (zie ook aanhangsel 3 voor parameters voor elk testmodel). Voor de vier modellen die aan deze testmethode voldoen, zijn standaardwerkwijzen (Standard Operating Procedures, SOP's) beschikbaar (32) (33) (34) (35).

COMPONENTEN VAN DE RHE-TESTMETHODE

Algemene voorwaarden

18. Om het epitheel op te bouwen moeten niet-getransformeerde humane keratinocyten worden gebruikt. Er moeten verschillende lagen levende epitheelcellen (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum) aanwezig zijn onder een functioneel stratum corneum. Het stratum corneum moet uit meerdere lagen bestaan en het vereiste lipideprofiel hebben, zodat een sterke en functionele barrière wordt gevormd waar cytotoxische ijkstoffen, bv. natriumdodecylsulfaat (SDS) of Triton X-100, niet snel doorheen kunnen dringen. De barrièrefunctie moet worden aangetoond en kan worden beoordeeld door de concentratie te bepalen waarin een ijkstof de weefsellevensvatbaarheid het weefsel met 50 % doet dalen (IC_{50}) na een vaste blootstellingstijd, of door de blootstellingstijd te bepalen die nodig is om de cellevensvatbaarheid met 50 % te doen dalen (ET_{50}) bij aanbrenging van de ijkstof in een bepaalde, vaste concentratie. De omsluitingseigenschappen van het model moeten voorkomen dat materiaal om het stratum corneum heen het levende weefsel kan bereiken. Dat zou een slecht model voor huidblootstelling opleveren. Het RhE-model mag niet verontreinigd zijn met bacteriën, virussen, mycoplasma of fungi.

Functionele voorwaarden

Levensvatbaarheid

19. De levensvatbaarheid wordt gekwantificeerd door middel van de MTT-test (31). De levensvatbare cellen van het RhE-weefselpreparaat kunnen de vitale kleurstof MTT reduceren tot een blauw MTT-formazanprecipitaat, dat vervolgens met isopropanol (of een vergelijkbaar oplosmiddel) uit het weefsel wordt geëxtraheerd. De optische densiteit (OD) van het extractieoplosmiddel alleen moet voldoende klein zijn, d.w.z. OD < 0,1. Het geëxtraheerde MTT-formazan kan worden gekwantificeerd met behulp van hetzij een meting van de standaard extinctie (OD) of een HPLC/UPLC-spectrofotometrieprocedure (36). Gebruikers van het RhE-model moeten waarborgen dat iedere gebruikte batch van het RhE-model voldoet aan gedefinieerde criteria voor de negatieve controle. Door de ontwikkelaar/leverancier van het RhE-model wordt een aanvaardbaarheidsbereik (boven- en ondergrens) voor de OD-waarden in negatieve controle (onder de omstandigheden van de testmethode voor huidirritatie) vastgesteld. In tabel 2 worden de aanvaardbaarheidsbereiken gegeven voor de vier gevalideerde RhE-modellen die in deze testmethode zijn opgenomen. Bij gebruik van HPLC/UPLC-spectrofotometrie moeten de OD-bereiken in negatieve controle in tabel 2 als aanvaardbaarheidscriterium voor de negatieve controles worden gebruikt. Gedocumenteerd moet worden dat de weefsels die in de negatieve controle worden gebruikt, gedurende de volledige blootstellingsperiode van de test in cultuur stabiel zijn (een vergelijkbare gemeten levensvatbaarheid opleveren).

Tabel 2: Aanvaardbaarheidsbereiken voor de OD-waarden in negatieve controle van de in deze TM opgenomen testmodellen

	Ondergrens aanvaardbaarheid	**Bovengrens aanvaardbaarheid**
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Barrièrefunctie

20. Het stratum corneum met de daarin aanwezige lipiden moet sterk genoeg zijn om snelle penetratie van cytotoxische ijkstoffen, bv. SDS of Triton X-100, te weerstaan, wat wordt beoordeeld aan de hand van de IC_{50} of ET_{50} (tabel 3).

Morfologie

21. Histologisch onderzoek van het RhE-model moet worden overgelegd om aan te tonen dat de structuur van het weefsel op die van de menselijke epidermis lijkt (onder meer een meerlagig stratum corneum).

Reproduceerbaarheid

22. De resultaten van de positieve en negatieve controles van de testmethode moeten reproduceerbaar zijn in de tijd.

Kwaliteitscontrole (QC)

23. Het RhE-model mag alleen worden gebruikt als de ontwikkelaar/leverancier aantoont dat iedere batch van het gebruikte RhE-model voldoet aan gedefinieerde productievrijgavecriteria, waarvan die voor *levensvatbaarheid* (punt 19), *barrièrefunctie* (punt 20) en *morfologie* (punt 21) de meest relevante zijn. Deze gegevens moeten aan de gebruikers van de testmethode worden verstrekt, zodat zij deze informatie in het testverslag kunnen opnemen. Door de ontwikkelaar/leverancier van het RhE-model moet een aanvaardbaarheidsbereik (boven- en ondergrens) worden vastgesteld voor de IC_{50} of de ET_{50}. Een betrouwbare voorspelling van irritatie-effecten kan uitsluitend worden gedaan op grond van resultaten verkregen met deugdelijk weefsel. In tabel 3 worden de aanvaardbaarheidsbereiken gegeven voor de vier testmodellen die in deze TG zijn opgenomen.

Tabel 3: QC-criteria voor batchvrijgave van de in deze TM opgenomen testmodellen

	Ondergrens aanvaardbaarheid	**Bovengrens aanvaardbaarheid**
EpiSkin™ (SM) (SDS-behandeling van 18 uur) (32)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (33)	ET_{50} = 4,0 uur	ET_{50} = 8,7 uur
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 uur	ET_{50} = 10,0 uur
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (SDS-behandeling van 18 uur) (35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

Het aanbrengen van de teststof en de controlestoffen

24. Er moeten ten minste drie weefselmonsters worden gebruikt voor iedere teststof en voor de controles in ieder experiment. Voor zowel vloeibare als vaste chemische stoffen geldt dat er zo veel teststof moet worden aangebracht dat het epidermisoppervlak gelijkmatig bedekt is, d.w.z. tussen de 26 en 83 µl/cm^2 of mg/cm^2, maar er mag geen oneindige dosis worden gebruikt (zie aanhangsel 3). In het geval van vaste chemische stoffen moet het epidermisoppervlak voor aanbrenging worden bevochtigd met gedeïoniseerd of gedestilleerd water, om voor een goed contact van de teststof met het epidermisoppervlak te zorgen. Indien mogelijk moeten vaste stoffen in de vorm van een fijn poeder worden getest. In sommige gevallen kan een nylongaas worden gebruikt als hulpmiddel voor het uitspreiden van de teststof (zie aanhangsel 3). Aan het eind van de blootstellingsperiode moet de teststof zorgvuldig met waterige buffer of 0,9 % NaCl van het epidermisoppervlak worden gewassen. Afhankelijk van de gebruikte RhE-testmodellen loopt de blootstellingsperiode uiteen van 15 tot 60 minuten, en de incubatietemperatuur van 20 tot 37 °C. Deze blootstellingsperioden en temperaturen zijn voor elke afzonderlijke RhE-testmethode geoptimaliseerd en vertegenwoordigen de verschillende intrinsieke

eigenschappen van de testmodellen (bv. barrièrefunctie) (zie aanhangsel 3).

25. In elk experiment moeten gelijktijdig uitgevoerde negatieve controles (NC) en positieve controles (PC) worden gebruikt om aan te tonen dat de levensvatbaarheid (aan de hand van de NC), de barrièrefunctie en de resulterende gevoeligheid (aan de hand van de positieve controles) van de weefsels binnen een gedefinieerd historisch aanvaardbaarheidsbereik liggen. Als PC-stof wordt een waterige SDS-oplossing van 5 % aanbevolen. Als negatieve controlestoffen zijn water of met fosfaat gebufferde fysiologische zoutoplossing (PBS) geschikt.

Metingen van de cellevensvatbaarheid

26. Volgens de testprocedure is het essentieel dat de levensvatbaarheid niet onmiddellijk na de blootstelling aan de teststof wordt gemeten, maar pas nadat het behandelde en gewassen weefsel voldoende lang is geïncubeerd in vers medium. Gedurende deze periode kan het weefsel herstellen van zwak irriterende effecten en vertonen zich duidelijke cytotoxische effecten. Bij de optimalisering van twee van de op RhE gebaseerde testmodellen die aan deze testmethode ten grondslag liggen (11) (12) (13) (14) (15), is gebleken dat een na-incubatie van 42 uur optimaal is.

27. De MTT-omzettingstest is een gestandaardiseerde kwantitatieve methode, en de aangewezen methode voor het meten van de cellevensvatbaarheid binnen deze testmethode. De test werkt goed met geconstrueerd driedimensionaal weefsel. Het huidmonster wordt 3 uur in een MTT-oplossing met een geschikte concentratie (bv. 0,3 - 1 mg/ml) gelegd. De levensvatbare cellen zetten het MTT om in blauw formazan. Het neergeslagen blauwe formazanproduct wordt vervolgens met een oplosmiddel (bv. isopropanol, aangezuurde isopropanol) uit het weefsel geëxtraheerd, en de formazanconcentratie wordt bepaald door de OD te meten bij 570 nm, bij een bandbreedte van maximaal ± 30 nm, of door middel van een HPLC/UPLC-spectrofotometrieprocedure (zie punt 34) (36).

28. De optische eigenschappen van de teststof of chemische effecten van de teststof op het MTT (teststoffen kunnen de kleurproductie bijvoorbeeld voorkomen of omkeren, of juist veroorzaken) kunnen de test storen en tot een foutieve bepaling van de levensvatbaarheid leiden. Dit kan gebeuren als een bepaalde teststof niet volledig van de huid wordt verwijderd door wassen, of als de stof in de epidermis penetreert. Als de teststof rechtstreekse effecten op het MTT heeft (bv. MTT-reductie), zelf gekleurd is, of tijdens de weefselbehandeling gekleurd raakt, moeten er aanvullende controles worden uitgevoerd om storing van de levensvatbaarheidsmeting door de teststof te detecteren en daarvoor te corrigeren (zie de punten 29 en 33). Een gedetailleerde beschrijving van hoe voor rechtstreekse MTT-reductie en interferentie door kleurstoffen kan worden gecorrigeerd, is

te vinden in de SOP's voor de vier gevalideerde modellen die in deze testmethode zijn opgenomen (32) (33) (34) (35).

29. Om rechtstreeks MTT reducerende stoffen te herkennen moet elke teststof worden toegevoegd aan vers bereide MTT-oplossing. Als het MTT-mengsel met de teststof blauw/paars wordt, wordt de teststof als een rechtstreeks MTT reducerende stof beschouwd en moet een verdere functionele toetsing van niet-levensvatbare RhE-weefsels worden uitgevoerd, ongeacht of de meting van de standaard extinctie (OD) of een HPLC/UPLC-spectrofotometrieprocedure wordt gebruikt. Bij deze aanvullende functionele toetsing worden gedode weefsels gebruikt die slechts een residuele metabole activiteit vertonen, maar de teststof wel absorberen op vergelijkbare wijze als levensvatbare weefsels. Om een niet-specifieke MTT-reductie (NSMTT) te genereren wordt elke MTT reducerende teststof op ten minste twee gedode duploweefsels aangebracht, die de gehele testprocedure ondergaan (32) (33) (34) (35). Per teststof is één NSMTT-controle voldoende, ongeacht het aantal onafhankelijk uitgevoerde tests/testruns. De werkelijke levensvatbaarheid van het weefsel wordt dan berekend als de procentuele levensvatbaarheid van het weefsel verkregen met levende weefsels die zijn blootgesteld aan de MTT reducerende stof, minus het percentage niet-specifieke MTT-reductie verkregen met de gedode weefsels die aan de zelfde MTT reducerende stof zijn blootgesteld, ten opzichte van de negatieve controle die gelijktijdig met de te corrigeren test is uitgevoerd (%NSMTT).

30. Om na te gaan of gekleurde teststoffen of teststoffen die gekleurd worden wanneer ze in contact komen met water of isopropanol, de test zouden kunnen verstoren en te beslissen of er aanvullende controles nodig zijn, moet een spectrumanalyse van de teststof in water (milieu tijdens blootstelling) en/of isopropanol (extractieoplossing) worden uitgevoerd. Als de teststof in water en/of isopropanol licht absorbeert in het bereik van 570 ± 30 nm, moeten er extra kleurstofcontroles worden uitgevoerd of moet als alternatief een HPLC/UPLC-spectrofotometrieprocedure worden gebruikt, in welk geval deze controles niet nodig zijn (zie de punten 33 en 34). Bij het uitvoeren van de meting van de standaard extinctie (OD) wordt elke verstorende gekleurde teststof op ten minste twee levensvatbare duploweefsels aangebracht, die de hele testprocedure doorlopen maar tijdens de MTT-incubatiestap geïncubeerd worden met medium in plaats van MTT-oplossing om zo tot een niet-specifieke kleurcontrole (NSC_{levend}-controle) te komen. Vanwege de inherente biologische variabiliteit van levende weefsels moet de NSC_{levend}-controle gelijktijdig worden uitgevoerd met het testen van de gekleurde teststof. In geval van meerdere testen moet er voor elke test die wordt uitgevoerd (in elke testrun), een onafhankelijke NSC_{levend}-controle worden verricht. De werkelijke levensvatbaarheid van het weefsel wordt dan berekend als de procentuele levensvatbaarheid verkregen met levende weefsels die zijn blootgesteld aan de verstorende teststof en geïncubeerd met MTT-oplossing, minus het percentage niet-specifieke kleur verkregen met levende weefsels die zijn blootgesteld aan

de verstorende teststof en geïncubeerd in medium zonder MTT, gelijktijdig uitgevoerd met de te corrigeren test (%NSC_{levend}).

31. Voor teststoffen waarvan wordt vastgesteld dat ze zowel rechtstreekse reductie van MTT (zie punt 29) als kleurinterferentie veroorzaken (zie punt 30), is naast de hierboven beschreven NSMTT- en NSC_{levend}-controles nog een derde reeks controles nodig, wanneer de meting van de standaard extinctie (OD) wordt uitgevoerd. Dit geldt doorgaans voor donkergekleurde (bv. blauwe, paarse of zwarte) teststoffen die de MTT-test verstoren, omdat hun intrinsieke kleur de beoordeling van hun vermogen om rechtstreeks MTT te reduceren zoals beschreven in punt 29 belemmert. Deze teststoffen binden mogelijk zowel aan levende als gedode weefsels en daarom corrigeert de NSMTT-controle mogelijk niet alleen voor potentiële rechtstreekse MTT-reductie door de teststof, maar ook voor kleurinterferentie die voortkomt uit de binding van de teststof aan de gedode weefsels. Dit zou kunnen leiden tot een dubbele correctie voor kleurinterferentie, aangezien de NSC_{levend}-controle al voor kleurinterferentie als gevolg van de binding van de teststof aan levende weefsels corrigeert. Om een mogelijke dubbele correctie voor kleurinterferentie te vermijden moet een derde controle voor niet-specifieke kleur in gedode weefsels (NSC_{gedood}) worden uitgevoerd. In deze extra controle wordt de teststof aangebracht op ten minste twee duplo's van gedood weefsel, die de gehele testprocedure doorlopen maar in de MTT-incubatiestap geïncubeerd worden met medium in plaats van met MTT-oplossing. Per teststof is één NSC_{gedood}-controle voldoende, ongeacht het aantal onafhankelijke tests/testruns dat wordt uitgevoerd, maar deze moet gelijktijdig worden uitgevoerd met de NSMTT-controle en, waar mogelijk, met dezelfde weefselbatch. De werkelijke levensvatbaarheid van het weefsel wordt dan berekend als de procentuele levensvatbaarheid verkregen met levende weefsels die zijn blootgesteld aan de teststof minus %NSMTT minus %NSC_{levend} plus het percentage niet-specifieke kleur verkregen met gedode weefsels die zijn blootgesteld aan de verstorende teststof en geïncubeerd met medium zonder MTT, ten opzichte van de negatieve controle die gelijktijdig met de te corrigeren test is uitgevoerd (%NSC_{gedood}).

32. Het is van belang op te merken dat niet-specifieke MTT-reductie en niet-specifieke kleurinterferenties ertoe kunnen leiden dat de meetwaarden voor het weefselextract buiten het lineariteitsbereik van de spectrofotometer vallen. Daarom moet elk laboratorium, alvorens te beginnen met het testen van teststoffen met het oog op regelgeving, eerst het lineariteitsbereik van de spectrofotometer bepalen met in de handel verkregen MTT-formazan (CAS-nr. 57360-69-7). Meting van de standaard extinctie (OD) met een spectrofotometer is een geschikte methode voor de beoordeling van rechtstreeks MTT reducerende stoffen en teststoffen die kleurinterferentie vertonen, als de OD's van de weefselextracten die worden verkregen met de teststof zonder correctie voor rechtstreekse MTT-reductie en/of kleurinterferentie, binnen het lineariteitsbereik van de spectrofotometer vallen of als de ongecorrigeerde procentuele levensvatbaarheid die met

de teststof wordt verkregen, al ≤ 50 % is. Niettemin moeten de resultaten voor teststoffen die een %NSMTT en/of een $\%NSC_{levend}$ van ≥ 50 % van de negatieve controle opleveren, met omzichtigheid worden benaderd, aangezien dit de drempelwaarde is die als scheiding tussen ingedeelde en niet-ingedeelde stoffen fungeert (zie punt 36).

33. Voor gekleurde teststoffen die vanwege een te sterke interferentie met de MTT-test niet compatibel zijn met de meting van de standaard extinctie (OD), kan wellicht de alternatieve HPLC/UPLC-spectrofotometrieprocedure voor het meten van MTT-formazan worden toegepast (zie punt 34) (36). In het HPLC/UPLC-spectrofotometriesysteem kan het MTT-formazan voordat het gekwantificeerd wordt, van de teststof worden gescheiden (36). Daarom zijn er bij gebruik van HPLC/UPLC-spectrofotometrie geen NSC_{levend}- of NSC_{gedood}-controles nodig, ongeacht de geteste chemische stof. Als echter vermoed wordt dat de teststof rechtstreeks MTT reduceert of een kleur heeft die de beoordeling van het vermogen om rechtstreeks MTT te reduceren (zoals beschreven in punt 29) belemmert, moeten er wel NSMTT-controles worden toegepast. Bij gebruik van HPLC/UPLC-spectrofotometrie voor het meten van MTT-formazan wordt de procentuele levensvatbaarheid van het weefsel berekend als percentage van de piekoppervlakte voor MTT-formazan verkregen met levende weefsels die aan de teststof zijn blootgesteld, ten opzichte van de piekoppervlakte voor MTT-formazan verkregen met de gelijktijdige negatieve controle. Voor teststoffen die rechtstreeks MTT kunnen reduceren, wordt de levensvatbaarheid van het weefsel berekend als de procentuele levensvatbaarheid van het weefsel verkregen met levende weefsels die aan de teststof zijn blootgesteld, minus %NSMTT. Tot slot zij erop gewezen dat rechtstreeks MTT reducerende stoffen die mogelijk ook kleurinterferentie vertonen, als ze na de behandeling in de weefsels achterblijven en MTT zo sterk reduceren dat dit OD's (met standaard OD-meting) of piekoppervlakten (met HPLC/UPLC-spectrofotometrie) oplevert voor de geteste weefselextracten die buiten het lineariteitsbereik van de spectrofotometer vallen, niet beoordeeld kunnen worden, hoewel dergelijke gevallen naar verwachting slechts zeer zelden voorkomen.

34. HPLC/UPLC-spectrofotometrie kan voor alle typen teststoffen (al dan niet gekleurd, al dan niet MTT reducerend) worden gebruikt voor het meten van MTT-formazan (36). Vanwege de diversiteit van HPLC/UPLC-spectrofotometriesystemen moet de deugdelijkheid van het HPLC/UPLC-spectrofotometriesysteem worden aangetoond alvorens het wordt gebruikt voor het kwantificeren van MTT-formazan in weefselextracten, door aan de aanvaardbaarheidscriteria te voldoen voor een reeks standaard deugdelijkheidsparameters op basis van de parameters beschreven in de voor de industrie bestemde leidraad van de Amerikaanse Food and Drug Administration voor de validering van bioanalytische methoden (36) (37). Deze kritische parameters en de bijbehorende aanvaardbaarheidscriteria worden weergegeven in aanhangsel 4. Als aan de in aanhangsel 4 gestelde aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt het HPLC/UPLC-

spectrofotometriesysteem als deugdelijk beschouwd en kan het worden gebruikt voor het meten van MTT-formazan onder de experimentele omstandigheden die worden beschreven in deze testmethode.

Aanvaardbaarheidscriteria

35. Bij elke testmethode met deugdelijke weefselbatches (zie punt 23) geeft de OD die men meet voor met de negatieve controle behandelde weefsels, per definitie de kwaliteit weer van de weefsels die het hele proces van verzending en ontvangst, evenals alle stappen uit het irritatietestprotocol hebben doorgemaakt. De OD-waarden van controles mogen niet onder historisch vastgestelde ondergrenzen komen. Evenzo moet het vermogen van de weefsels om op een irriterende stof te reageren onder de specifieke omstandigheden van de testmethode (zie aanhangsel 3 en voor nadere informatie de SOP's van de vier testmodellen die in deze TG zijn opgenomen (32) (33) (34) (35)) tot uitdrukking komen in metingen met weefsels die met PC, d.w.z. 5 % waterige SDS-oplossing, zijn behandeld. De bijbehorende en geschikte grenzen voor de toegestane variabiliteit tussen duploweefsels, d.w.z. standaarddeviaties (SD's), moeten binnen de aanvaardbaarheidsgrenzen vallen die voor het gebruikte testmodel zijn vastgesteld (zie aanhangsel 3).

Interpretatie van resultaten en voorspellingsmodel

36. De met elke teststof verkregen OD-waarden kunnen worden gebruikt voor de berekening van een levensvatbaarheid die genormaliseerd is ten opzichte van de negatieve controle, die op 100 % wordt gesteld. Wanneer HPLC/UPLC-spectrofotometrie wordt gebruikt, wordt de procentuele levensvatbaarheid van het weefsel berekend als percentage van de piekoppervlakte voor MTT-formazan verkregen met levende weefsels die aan de teststof zijn blootgesteld, ten opzichte van de piekoppervlakte voor MTT-formazan verkregen met de gelijktijdige negatieve controle. De drempelwaarde van de procentuele cellevensvatbaarheid die als scheiding tussen irriterende en niet-geclassificeerde teststoffen fungeert, en de statistische procedure(s) die wordt/worden gebruikt om de resultaten te evalueren en irriterende stoffen te identificeren, moeten duidelijk worden gespecificeerd en gedocumenteerd, en de juistheid daarvan moet worden aangetoond (zie SOP's van de testmodellen voor informatie). De drempelwaarden voor de voorspelling van irritatie zijn hieronder gegeven:

- De teststof wordt geïdentificeerd als stof die moet worden ingedeeld en geëtiketteerd overeenkomstig VN-GHS-/CLP (categorie 2 of categorie 1), indien de gemiddelde procentuele levensvatbaarheid van het weefsel na blootstelling en na-incubatie minder is dan of gelijk is aan (≤) 50 %. Aangezien de RhE-testmodellen die onder deze testmethode vallen, geen onderscheid kunnen maken tussen de VN-GHS/CLP-categorieën 1 en 2, zijn er voor de uiteindelijke indeling van de teststof aanvullende gegevens over huidcorrosie nodig (zie ook de IATA-leidraad van de OESO (3)). Indien wordt vastgesteld dat de teststof niet-corrosief is (op basis van TM B.40, B.40 bis of B.65) en de levensvatbaarheid

van het weefsel na blootstelling aan de teststof en na-incubatie minder is dan of gelijk is aan (≤) 50 %, wordt de teststof beschouwd als irriterend voor de huid overeenkomstig VN-GHS/CLP-categorie 2.

- Afhankelijk van het regelgevend kader in de OESO-landen mag de teststof als niet irriterend voor de huid worden beschouwd overeenkomstig de VN-GHS-/CLP-categorie "Geen categorie", indien de levensvatbaarheid van het weefsel na blootstelling en na-incubatie meer is dan (>) 50 %.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

37. Voor elk experiment moeten gegevens van individuele weefselmonsters (bv. de OD-waarden en de berekende procentuele cellevensvatbaarheid voor elke teststof, met inbegrip van de indeling) in tabelvorm worden gerapporteerd, met vermelding van gegevens uit herhaalde experimenten, indien van toepassing. Daarnaast moeten voor elk experiment gemiddelden ± standaarddeviatie worden vermeld. Waargenomen interacties met het MTT-reagens en gekleurde teststoffen moeten voor alle geteste stoffen worden gemeld.

Testverslag

38. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof en controlestoffen:

- stof die uit één component bestaat: chemische identificatiegegevens, zoals IUPAC- of CAS-naam, CAS-nummer, SMILES- of InChI-code, structuurformule, zuiverheid, chemische identiteit van onzuiverheden, indien van toepassing en praktisch haalbaar enz.;
- stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB en mengsel: voor zover mogelijk, karakterisering aan de hand van chemische identiteit (zie hierboven), kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen van de bestanddelen;
- fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water en aanvullende fysisch-chemische eigenschappen, indien relevant;
- bron, partijnummer indien beschikbaar;
- behandeling van de teststof/controlestoffen voorafgaand aan het testen, indien van toepassing (bv. opwarming, malen);
- stabiliteit van de teststof, uiterste gebruiksdatum, of datum voor heranalyse, indien bekend;
- bewaaromstandigheden.

Het gebruikte RhE-model en -protocol (en motivering voor de keuze, indien van toepassing)

Testomstandigheden:

- het gebruikte RhE-model (inclusief batchnummer);
- kalibratie-informatie voor de meetapparatuur die voor het kwantificeren van MTT-formazan is gebruikt (bv. een spectrofotometer), golflengte en bandbreedte (indien van toepassing), en lineariteitsbereik van de meetapparatuur; een beschrijving van de methode die voor het kwantificeren van MTT-formazan is gebruikt;
- een beschrijving van de kwalificatie van het HPLC/UPLC-spectrofotometriesysteem, indien van toepassing; volledige ondersteunende informatie over het specifieke gebruikte huidmodel, met inbegrip van de deugdelijkheid daarvan. Hieronder moet ten minste informatie zijn over:

    i) levensvatbaarheid;

    ii) barrièrefunctie;

    iii) morfologie;

    iv) reproduceerbaarheid en voorspelbaarheid;

    v) kwaliteitscontroles (QC) van het model;
- verwijzingen naar historische gegevens over het model. Hieronder valt ten minste de aanvaardbaarheid van de QC-gegevens met verwijzing naar historische batchgegevens.
- aantoning van bekwaamheid in de toepassing van de testmethode voorafgaand aan routinematig gebruik door middel van het testen van de stoffen voor bekwaamheidstoetsing.

Testprocedure:

- gedetailleerde gegevens over de gebruikte procedure (met inbegrip van de gebruikte procedures voor het wassen na de blootstellingsperiode); de gebruikte dosis van de teststof en de controles;
- duur en temperatuur van de blootstelling en de na-incubatietijd;
- indicatie van de controles die zijn gebruikt voor rechtstreeks MTT-reducerende stoffen en/of gekleurde teststoffen, indien van toepassing;
- het aantal gebruikte duploweefsels per teststof en controles (positieve controle, negatieve controle en NSMTT, NSC_{levend} en NSC_{gedood}, indien van toepassing);
- een beschrijving van de toegepaste beslissingscriteria/het toegepaste voorspellingsmodel op basis van het gebruikte RhE-model;
- een beschrijving van eventuele modificaties van de testprocedure (met inbegrip van procedures voor het wassen).

Aanvaardbaarheidscriteria voor de test en testruns:

- gemiddelden van de positieve en negatieve controles en aanvaardbaarheidsbereiken op basis van historische gegevens; aanvaardbare variabiliteit tussen de duploweefsels voor de positieve en negatieve controles;
- aanvaardbare variabiliteit tussen de duploweefsels voor de teststof.

Resultaten:

- een tabel met gegevens voor de afzonderlijke teststof voor elke testrun en elke duplometing met inbegrip van OD of MTT-formazan-piekoppervlakte, procentuele levensvatbaarheid van de weefsels, gemiddelde procentuele levensvatbaarheid van de weefsels en standaarddeviatie;
- indien van toepassing: resultaten van de gebruikte controles voor rechtstreeks MTT reducerende stoffen en/of gekleurde teststoffen, met inbegrip van OD of MTT-formazan-piekoppervlakte, %NSMTT, $\%NSC_{levend}$, $\%NSC_{gedood}$, standaarddeviatie en uiteindelijke gecorrigeerde percentage voor de levensvatbaarheid van de weefsels;
- resultaten verkregen met de teststof(fen) en controles ten opzichte van de vastgestelde aanvaardbaarheidscriteria voor de test en testruns;
- een beschrijving van andere waargenomen effecten;
- de afgeleide indeling met vermelding van het gebruikte voorspellingsmodel/de gehanteerde beslissingscriteria.

Bespreking van de resultaten

Conclusies

LITERATUUR

(1) Verenigde Naties (VN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, VN New York en Genève, 2013. Beschikbaar op: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) EURL-CEVMA (2009). Statement on the "Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards", gepubliceerd door het raadgevend wetenschappelijk comité van het CEVMA (ESAC31), 9 april 2009. Beschikbaar op: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf

(3) OESO (2014). Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(4) Hoofdstuk B.4 van deze bijlage, Acute huidirritatie/corrosie.

(5) Hoofdstuk B.40 van deze bijlage, In-vitrohuidcorrosie: transcutane elektrische weerstand (TEW).

(6) Hoofdstuk B.40 bis van deze bijlage, In-vitrohuidcorrosie: testmethode met gereconstrueerde humane epidermis (RhE).

(7) Hoofdstuk B.65 van deze bijlage, In-vitrohuidcorrosie: testmethode op basis van de membraanbarrière.

(8) OESO (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(9) OESO (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351-367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329-349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.

(16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.

(17) Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α.

(18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603-619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351-358.

(20) EURL-CEVMA (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, gepubliceerd door het raadgevend wetenschappelijk comité van het Europees Centrum voor de validatie van alternatieve methoden (CEVMA) (ESAC26), 27 april 2007. Beschikbaar op: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf

(21) EURL-CEVMA (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *NB: dit zijn de oorspronkelijke prestatienormen die zijn gebruikt voor de validering van de twee testmethoden. Deze prestatienormen mogen niet meer worden gebruikt omdat er intussen een bijgewerkte versie (8) beschikbaar is.*

(22) EURL-CEVMA (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, gepubliceerd door het raadgevend wetenschappelijk comité van het CEVMA (ESAC29), 5 november 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf

(23) OESO (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, OESO, Parijs.

(24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol* Sci, 34, 327-334

(25) Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111-122

(26) OESO (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 159), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(27) OESO (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 155), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.

(29) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231-243.

(30) Eskes, C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol*.Pharmacol. 62, 393-403).

(31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(32) EpiSkin™ (February 2009). SOP, Version 1.8ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals

(33) EpiDerm™ (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).

(34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.

(35) LabCyte (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model "LabCyte EPI-MODEL24"

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Manuscript in voorbereiding.

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

(38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, in: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(39) EURL-CEVMA (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *NB: dit is de huidige versie van de prestatienormen van het CEVMA, bijgewerkt in 2009 met het oog op de tenuitvoerlegging van het VN-GHS. Deze prestatienormen mogen niet meer worden gebruikt omdat er intussen een bijgewerkte versie (8) beschikbaar is met betrekking tot deze TG.*

(40) EURL-CEVMA (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, gepubliceerd door het raadgevend wetenschappelijk comité van het CEVMA (ESAC31), 8 juli 2009.

(41) Europese Commissie (2001). Richtlijn 2001/59/EG van de Commissie van 6 augustus 2001 tot achtentwintigste aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van Richtlijn 67/548/EEG van de Raad betreffende de aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen inzake de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke stoffen, PB L 225, 1-333.

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een testmethode, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden uitgevoerd. De betrouwbaarheid wordt beoordeeld door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid (9).

Cellevensvatbaarheid: parameter waarmee de totale activiteit van een celpopulatie wordt weergegeven, bijvoorbeeld als het vermogen van cellulaire mitochondriale dehydrogenasen om de vitale kleurstof MTT (3-[4,5-dimethylthiazool-2-yl]-2,5-difenyltetrazoliumbromide) te reduceren. Deze parameter is, afhankelijk van het gemeten eindpunt en de opzet van de test, gecorreleerd met het totale aantal levende cellen en/of de vitaliteit van de cellen.

Chemische stof: een substantie of mengsel.

Concordantie: dit is een maat voor de prestaties voor testmodellen die een categoriale uitkomst geven en het is één aspect van relevantie. Deze term en de term "nauwkeurigheid" worden soms door elkaar gebruikt; de term wordt gedefinieerd als het percentage van alle geteste chemische stoffen die correct als positief of negatief worden geclassificeerd. De concordantie is sterk afhankelijk van de prevalentie van positieven in de typen teststoffen die worden onderzocht (9).

ET_{50}: kan worden geraamd door vaststelling van de blootstellingstijd die nodig is om de cellevensvatbaarheid met 50 % te doen dalen bij aanbrenging van de ijkstof in een bepaalde, vaste concentratie. Zie ook IC_{50}.

Gevoeligheid: het percentage van alle positieve/actieve teststoffen dat door de test correct wordt ingedeeld. Dit is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert en is een belangrijke factor voor de beoordeling van de relevantie van een testmethode (9).

GHS (mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen van de Verenigde Naties (VN)): een systeem voor de indeling van chemische stoffen (stoffen en mengsels) op basis van gestandaardiseerde soorten en niveaus van gevaren van fysische aard en gevaren voor de gezondheid en het milieu, en dat de desbetreffende voorlichtingselementen bepaalt, zoals pictogrammen, signaalwoorden, gevarenaanduidingen, voorzorgsmaatregelen en veiligheidsinformatiebladen, waarmee informatie over de schadelijke effecten van de stoffen kenbaar wordt gemaakt teneinde mensen (waaronder werkgevers, werknemers, transporteurs, consumenten en spoedhulpverleners) en het milieu te beschermen (1).

HPLC: hogeprestatievloeistofchromatografie.

IATA: Integrated Approach on Testing and Assessment (geïntegreerde test- en beoordelingsbenadering).

IC_{50}: kan worden geraamd door vaststelling van de concentratie waarin een ijkstof de levensvatbaarheid van de weefsels met 50 % doet dalen (IC_{50}) na een vaste blootstellingstijd. Zie ook ET_{50}.

In-vivohuidirritatie: het ontstaan van reversibele beschadiging van de huid na het aanbrengen van een teststof gedurende maximaal 4 uur. Huidirritatie is een lokaal optredende reactie van het aangedane huidweefsel die zich kort na stimulatie voordoet (38). Huidirritatie wordt veroorzaakt door een lokale ontstekingsreactie van het natuurlijke (niet-specifieke) immuunsysteem van het huidweefsel. Het voornaamste kenmerk is dat het een reversibel proces is waarbij ontstekingsreacties en de meeste klinische symptomen van ontstekinggerelateerde irritatie (erytheem, oedeem, jeuk en pijn) optreden.

Mengsel: een mengsel of oplossing bestaande uit twee of meer stoffen.

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromide; thiazolylblauw tetrazoliumbromide.

Nauwkeurigheid: de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de testmethode en erkende referentiewaarden. Dit is een maat voor de prestaties van de testmethode en één aspect van relevantie. Deze term en de term "concordantie", waaronder het percentage correcte uitkomsten van een testmethode wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt (9).

NSC_{gedood}: niet-specifieke kleur in gedode weefsels.

NSC_{levend}: niet-specifieke kleur in levende weefsels.

NSMTT: niet-specifieke MTT-reductie.

Oneindige dosis: hoeveelheid op de epidermis aangebrachte teststof die groter is dan de hoeveelheid die nodig is om het epidermisoppervlak volledig en gelijkmatig te bedekken.

PC: positieve controle, een monster met alle bestanddelen van een testsysteem dat met een chemische stof behandeld werd waarvan bekend is dat deze een positieve respons opwekt. Om te verzekeren dat variabiliteit in de positievecontrolerespons doorheen de tijd kan worden beoordeeld, mag de grootte van de positieve respons niet buitensporig zijn.

Prestatienormen: normen, gebaseerd op een gevalideerde testmethode, die de basis vormen voor de beoordeling van de vergelijkbaarheid van een voorgestelde, in mechanistisch en functioneel opzicht gelijksoortige testmethode. Hieronder begrepen zijn: i) essentiële componenten van de testmethode; ii) een minimumlijst van referentiestoffen die zijn gekozen uit de stoffen die zijn gebruikt om de aanvaardbare prestaties van de gevalideerde testmethode aan te tonen; en iii) de vergelijkbare nauwkeurigheids- en betrouwbaarheidsniveaus die door de voorgestelde testmethode moeten worden gehaald wanneer ze worden beoordeeld aan de hand van de minimumlijst van referentiestoffen; deze waarden zijn gebaseerd op de waarden die voor de gevalideerde testmethode zijn verkregen (9).

Relevantie: beschrijving van het verband van de test met het te onderzoeken effect en of de test betekenis heeft en nuttig is voor een bepaald doel. Het is de mate waarin de test het te onderzoeken biologische effect correct meet of voorspelt. Relevantie omvat een beoordeling van de nauwkeurigheid (concordantie) van een testmethode (9).

Specificiteit: het percentage van alle negatieve/inactieve teststoffen dat door de test correct wordt ingedeeld. Dit is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert en is een belangrijke factor voor de beoordeling van de relevantie van een testmethode (9).

Stof: een chemisch element en de verbindingen ervan, zoals zij voorkomen in natuurlijke toestand of bij de productie ontstaan, met inbegrip van alle additieven die nodig zijn voor het behoud van de stabiliteit ervan en alle onzuiverheden ten gevolge van het toegepaste procedé, doch met uitzondering van elk oplosmiddel dat kan worden afgescheiden zonder aantasting van de stabiliteit van de stof of wijziging van de samenstelling ervan.

Stof die uit één component bestaat: een stof die wordt gekenmerkt door haar kwantitatieve samenstelling en waarin een hoofdcomponent aanwezig is in een concentratie van ten minste 80 % (w/w).

Stof die uit meerdere componenten bestaat: een stof die wordt gekenmerkt door haar kwantitatieve samenstelling en waarin meer dan één hoofdcomponent aanwezig is in een concentratie van ≥ 10 % (w/w) en < 80 % (w/w). Een stof die uit meerdere componenten bestaat, is het resultaat van een fabricageproces. Het verschil tussen mengsels en stoffen die uit meerdere componenten bestaan, is dat mengsels worden verkregen door twee of meer stoffen zonder chemische reactie met elkaar te vermengen. Een stof die uit meerdere componenten bestaat, is het resultaat van een chemische reactie.

Testrun: een testrun bestaat uit een of meer teststoffen die gelijktijdig worden getest met een negatieve en een positieve controle.

Teststof: iedere stof of ieder mengsel die/dat met deze testmethode wordt getest.

UPLC: ultrahogeprestatievloeistofchromatografie.

UVCB: stoffen met een onbekende of variabele samenstelling, complexe reactieproducten en biologische materialen.

Vervangende test: een test, ontworpen ter vervanging van een voor de identificatie van gevaren en/of risicobeoordeling geaccepteerde en routinematig gebruikte test, waarvan is vastgesteld dat hij, in vergelijking met de geaccepteerde test, de gezondheid van mens of dier of het milieu, naargelang het geval, gelijke of betere bescherming biedt voor alle mogelijke testsituaties en chemische stoffen (9).

Aanhangsel 2

TESTMODELLEN DIE IN DEZE TESTMETHODE ZIJN OPGENOMEN

Nr.	Naam van het testmodel	Type valideringsstudie	Referenties
1	**EpiSkin™**	Volledige prospectieve valideringsstudie (2003-2007). De componenten van dit model werden gebruikt voor het vaststellen van de essentiële testmethodecomponenten van de oorspronkelijke en de bijgewerkte prestatienormen van het Europees Centrum voor de validatie van alternatieve methoden (CEVMA) (39) (40) (21)*. Bovendien vormden de gegevens van deze methode met betrekking tot het identificeren van niet-ingedeelde vs. ingedeelde stoffen de belangrijkste basis voor het vaststellen van de waarden voor specificiteit en gevoeligheid in de oorspronkelijke prestatienormen*.	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	**EpiDerm™ SIT (EPI-200)**	EpiDerm™ (*oorspronkelijk*): in eerste instantie werd het testmodel samen met nr. 1 aan een volledige prospectieve validering onderworpen tussen 2003 en 2007. De componenten van dit model werden gebruikt voor het vaststellen van de essentiële testmethodecomponenten van de oorspronkelijke en de bijgewerkte prestatienormen van het CEVMA (39) (40) (21)*. **EpiDerm™ SIT (EPI-200):** in 2008 werd een gewijzigde versie van de oorspronkelijke EpiDerm™ gevalideerd aan de hand van de oorspronkelijke prestatienormen van het CEVMA (21)*	(2) ((10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	**SkinEthic™ RHE**	Valideringsstudie op basis van de oorspronkelijke prestatienormen van het CEVMA (21) in 2008*.	(2) (21) (22) (23) (31)
4	**LabCyte EPI-MODEL24 SIT**	Valideringsstudie (2011-2012) op basis van de prestatienormen van OESO TG 439 (8) die gebaseerd zijn op de bijgewerkte prestatienormen van het CEVMA* (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) en prestatienormen voor deze TG (8)*

*) De oorspronkelijke prestatienormen van het CEVMA (21) kwamen tot stand in 2007 bij de voltooiing van de prospectieve valideringsstudie (16) waarin de prestaties van testmodellen nrs. 1 en 2 werden beoordeeld op basis van het classificatiesysteem zoals beschreven in de 28e aanpassing van de EU-richtlijn betreffende gevaarlijke stoffen (41). Met het VN-GHS (1) en de EU-CLP-verordening, beide daterend uit 2008, werd de drempelwaarde die als scheiding tussen niet-ingedeelde en ingedeelde stoffen fungeert, de facto van een in-vivoscore van 2,0 naar 2,3 verschoven. Om de nauwkeurigheidswaarden en de lijst van referentiestoffen van de CEVMA-prestatienormen aan deze veranderde wettelijke vereiste aan te passen, werden deze in 2009 bijgewerkt (2) (39) (40). Net als de oorspronkelijke prestatienormen waren de bijgewerkte prestatienormen voor een groot deel gebaseerd op gegevens van de modellen nr. 1 en 2 (16), maar er werden aanvullende gegevens

gebruikt over referentiestoffen van model nr. 3. In 2010 werden de bijgewerkte CEVMA-prestatienormen gebruikt om de prestatienormen voor deze TG vast te stellen (8). Voor de toepassing van deze testmethode wordt EpiSkin™ als de VRM beschouwd, omdat dit model voor de ontwikkeling van alle criteria van de prestatienormen werd gebruikt. Gedetailleerde informatie over de valideringsstudies, een compilatie van de gegenereerde gegevens en achtergronden bij de aanpassingen aan de prestatienormen die nodig waren vanwege de tenuitvoerlegging van het VN-GHS en de CLP-verordening, zijn te vinden in de toelichting (Explanatory Background Document) van het CEVMA/BfR bij de overeenkomstige OESO TG 439 (23).

SIT: huidirritatietest (Skin Irritation Test)

RhE: gereconstrueerde humane epidermis (Reconstructed Human Epidermis)

Aanhangsel 3

SPECIFIEKE PROTOCOLPARAMETERS VOOR ELK VAN DE TESTMETHODEN DIE IN DEZE TESTMETHODE ZIJN OPGENOMEN

De protocollen voor de RhE-modellen vertonen grote overeenkomsten en schrijven in het bijzonder allemaal een na-incubatietijd voor van 42 uur (32) (33) (34) (35). De variaties zitten voornamelijk in drie parameters die verband houden met de verschillende barrièrefuncties van de testmodellen, te weten: A) pre-incubatietijd en -volume, B) het aanbrengen van de teststoffen en C) na-incubatievolume.

	EpiSkin™ (SM)	**EpiDerm™ SIT (EPI-200)**	**SkinEthic RHE™**	**LabCyte EPI-MODEL24 SIT**
A) Pre-incubatie				
Incubatietijd	18 - 24 uur	18 - 24 uur	< 2 uur	15 - 30 uur
Hoeveelheid medium	2 ml	0,9 ml	0,3 of 1 ml	0,5 ml
B) Het aanbrengen van de teststof				
Voor vloeistoffen	10 µl (26 µl/cm^2)	30 µl (47 µl/cm^2)	16 µl (32 µl/cm^2)	25 µl (83 µl/cm^2)
Voor vaste stoffen	10 mg (26 mg/cm^2) + DW (5 µl)	25 mg (39 mg/cm^2) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm^2) + DW (10 µl)	25 mg (83 mg/cm^2) + DW (25 µl)
Gebruik van nylongaas	niet gebruikt	indien nodig	aangebracht	niet gebruikt
Totale aanbrengings-tijd	15 minuten	60 minuten	42 minuten	15 minuten
Aanbrengings-temperatuur	kamertemp.	a) 25 min bij kamertemp. b) 35 min bij 37 ºC	kamertemp.	kamertemp.
C) Na-incubatievolume				
Hoeveelheid medium	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
D) Maximaal aanvaardbare variabiliteit				
Standaard-deviatie tussen duploweefsels	SD □18	SD □18	SD □18	SD □18

kamertemp.: kamertemperatuur
DW: gedestilleerd water
DPBS: met fosfaat gebufferde fysiologische zoutoplossing van Dulbecco

Aanhangsel 4

KRITISCHE PARAMETERS EN AANVAARDBAARHEIDSCRITERIA VOOR KWALIFICATIES VAN EEN HPLC/UPLC-SPECTROFOTOMETRIESYSTEEM VOOR METING VAN UIT RHE-WEEFSELS GEËXTRAHEERD MTT-FORMAZAN

Parameter	Protocol ontleend aan FDA-leidraad (36) (37)	Aanvaardbaarheidscriteria
Selectiviteit	Analyse van isopropanol, levende blanco (isopropanolextract van onbehandelde levende RhE-weefsels), dode blanco (isopropanolextract van onbehandelde gedode RhE-weefsels)	$Oppervlakte_{interferentie}$ ≤ 20 % van $Oppervlakte_{LLOQ}$[1]
Precisie	Kwaliteitscontroles (d.w.z. MTT-formazan bij 1,6 µg/ml, 16 µg/ml en 160 µg/ml) in isopropanol (n=5)	CV ≤ 15 % of ≤ 20 % voor de LLOQ
Nauwkeurigheid	Kwaliteitscontroles in isopropanol (n=5)	%Afw. ≤ 15 % of ≤ 20 % voor de LLOQ
Matrixeffect	Kwaliteitscontroles in levende blanco (n=5)	85 % ≤ percentage matrixeffect ≤ 115 %
Carry-over	Analyse van isopropanol na een ULOQ[2]-standaard	$Oppervlakte_{interferentie}$ ≤ 20 % van $Oppervlakte_{LLOQ}$
Reproduceerbaarheid (binnen één dag)	3 onafhankelijke kalibratiecurven (op basis van 6 achtereenvolgende 1/3 verdunningen van MTT-formazan in isopropanol beginnend bij de ULOQ, d.w.z. 200 µg/ml); Kwaliteitscontroles in isopropanol (n=5)	Kalibratiecurven: %Afw. ≤ 15 % of ≤ 20 % voor de LLOQ Kwaliteitscontroles: %Afw. ≤ 15 % en CV ≤ 15 %
Reproduceerbaarheid (van dag tot dag)	Dag 1: 1 kalibratiecurve en kwaliteitscontroles in isopropanol (n=3) Dag 2: 1 kalibratiecurve en kwaliteitscontroles in isopropanol (n=3) Dag 3: 1 kalibratiecurve en kwaliteitscontroles in isopropanol (n=3)	
Kortetermijnstabiliteit van MTT-formazan in RhE-weefselextract	Kwaliteitscontroles op levende blanco (n=3) geanalyseerd op de dag van bereiding en na 24 uur bewaring bij kamertemperatuur	%Afw. ≤ 15 %
Langetermijnstabiliteit van MTT-formazan in RhE-weefselextract, indien nodig	Kwaliteitscontroles op levende blanco (n=3) geanalyseerd op de dag van bereiding en na meerdere dagen bewaring bij een gespecificeerde temperatuur (bv. 4 °C, -20 °C, -80 °C)	%Afw. ≤ 15 %

[1]LLOQ: onderste bepaalbaarheidsgrens (Lower Limit of Quantification), gedefinieerd als overeenkomend met 1-2 % levensvatbaarheid van het weefsel, d.w.z. 0,8 µg/ml.

[2]ULOQ: bovenste bepaalbaarheidsgrens (Upper Limit of Quantification), gedefinieerd als ten minste tweemaal zo hoog als de hoogste verwachte MTT-formazanconcentratie in isopropanolextracten van negatieve controles d.w.z. 200 µg/ml."

8) In deel B worden de volgende hoofdstukken toegevoegd:

"B.63 REPRODUCTIE-/ONTWIKKELINGSTOXICITEIT, SCREENINGTEST

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 421 (2016) van de OESO. OESO-richtlijnen voor het testen van chemische stoffen worden periodiek in het licht van de wetenschappelijke vorderingen getoetst. De oorspronkelijke screeningtestrichtlijn 421 werd vastgesteld in 1995 op basis van een protocol voor een voorbereidende screeningtest voor reproductietoxiciteit (Preliminary Reproduction Toxicity Screening Test) die was besproken op twee bijeenkomsten van deskundigen, in 1990 in Londen (1) en in 1992 in Tokio (2).

2. Deze testmethode is bijgewerkt met eindpunten die relevant zijn voor hormoonontregelaars, naar aanleiding van de prioritaire actie die de OESO in 1998 is gestart om bestaande testrichtlijnen te herzien en nieuwe testrichtlijnen te ontwikkelen voor het screenen en testen op potentiële hormoonontregelaars (3). Zo werd OESO TG 407 (toxiciteitsonderzoek (oraal) op knaagdieren bij herhaalde toediening (28 dagen), hoofdstuk B.7 van deze bijlage) in 2008 uitgebreid door er geschikte parameters in op te nemen om de endocriene werking van teststoffen vast te kunnen stellen. Met de bijwerking van TG 421 werd beoogd om in screeningtestrichtlijnen een aantal voor hormoonontregelaars relevante eindpunten op te nemen, waarbij de blootstellingsperioden bepaalde gevoelige perioden in de ontwikkeling (prenatale en vroeg-postnatale perioden) beslaan.

3. De aanvullende, voor hormoonontregelaars relevante eindpunten die werden geselecteerd en die ook deel uitmaken van TG 443 (uitgebreid onderzoek naar reproductietoxiciteit over één generatie, hoofdstuk B.56 van deze bijlage), werden in TG 421 opgenomen op basis van een haalbaarheidsstudie waarin wetenschappelijke en technische vragen met betrekking tot de opname ervan werden onderzocht, alsook aanpassingen van de testopzet die eventueel voor de opname ervan noodzakelijk zouden zijn (4).

4. Deze testmethode is ontworpen voor het verkrijgen van beperkte informatie over de effecten van een teststof op het mannelijke en vrouwelijke voortplantingsvermogen, zoals de gonadale functie, paringsgedrag, conceptie, ontwikkeling van de vrucht en geboorte. Deze testmethode is geen alternatief noch een vervanging voor de bestaande testmethoden B.31, B.34, B.35 of B.56.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

5. Deze screeningtestmethode kan worden gebruikt om oriënterende gegevens te verkrijgen over mogelijke effecten op de voortplanting en/of ontwikkeling, hetzij in een vroeg stadium van de beoordeling van de toxicologische eigenschappen van chemische stoffen, hetzij voor chemische stoffen waarbij dergelijke effecten worden vermoed. De methode kan ook worden gebruikt als deel van een reeks initiële screeningtests voor bestaande chemische stoffen waarvoor weinig of geen toxicologische gegevens beschikbaar zijn, als bereikbepalingsonderzoek voor uitvoeriger onderzoeken naar reproductie-/ontwikkelingstoxiciteit, of wanneer het gebruik ervan anderszins relevant wordt geacht. Bij het uitvoeren van het onderzoek moeten de richtsnoeren en overwegingen worden gevolgd die worden beschreven in de OESO-leidraad nr. 19 over het herkennen, beoordelen en gebruiken van klinische verschijnselen als humane eindpunten voor proefdiergebruik bij veiligheidsbeoordelingen (5).

6. Deze testmethode verschaft geen volledige informatie over alle aspecten van reproductie en ontwikkeling. Met name voor het detecteren van postnatale gevolgen van prenatale blootstelling of effecten die tijdens postnatale blootstelling zijn veroorzaakt, is de informatie die deze methode oplevert slechts beperkt. Als gevolg van (onder andere) het betrekkelijk kleine aantal dieren in de dosisgroepen, de selectiviteit van de eindpunten en de korte onderzoeksduur, kan met deze methode geen bewijs worden verkregen om definitief te concluderen dat een stof geen effecten veroorzaakt. Als er verder geen gegevens zijn uit andere tests op reproductie-/ontwikkelingstoxiciteit, zijn positieve resultaten evenwel nuttig voor een eerste gevarenbeoordeling en kunnen ze als basis dienen voor beslissingen over de noodzaak en timing van aanvullende tests.

7. De resultaten die worden verkregen met de parameters die met het endocriene systeem te maken hebben, moeten worden gezien in samenhang met het conceptueel kader van de OESO voor het testen en beoordelen van hormoonontregelende stoffen (6). In dit conceptueel kader is de uitgebreide TG 421 van de OESO ondergebracht in niveau 4 als een in-vivobepaling waarmee gegevens kunnen worden verkregen over schadelijke effecten op eindpunten die relevant zijn voor het endocrien systeem. Een endocrien signaal hoeft op zichzelf echter niet als voldoende bewijs te worden beschouwd dat de teststof een hormoonontregelaar is.

8. Bij deze testmethode wordt aangenomen dat de teststof oraal wordt toegediend. Als andere blootstellingsroutes worden gebruikt, moet de methode mogelijk worden aangepast.

9. Voordat de testmethode wordt gebruikt op een mengsel om gegevens te genereren voor een beoogd regelgevingsdoel, moet worden nagegaan of, en zo ja, waarom deze methode betrouwbare resultaten oplevert voor dat doel. Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is.

10. De gebruikte definities zijn opgenomen in aanhangsel 1.

PRINCIPE VAN DE TEST

11. De teststof wordt in geleidelijk oplopende doseringen aan verschillende groepen mannetjes en vrouwtjes toegediend. De mannetjes moeten ten minste vier weken lang de teststof toegediend krijgen, tot en met de dag voordat ze worden gedood (inclusief twee weken voorafgaand aan het paren, tijdens de paringsperiode en ongeveer twee weken na het paren). Gezien de beperkte doseringsperiode vóór paring, is de vruchtbaarheid mogelijk geen bijzonder gevoelige indicator voor testiculaire toxiciteit. Een uitvoerig histologisch onderzoek van de testes is daarom noodzakelijk. De combinatie van een twee weken durende doseringsperiode voor het paren, gevolgd door waarnemingen op het gebied van paring/vruchtbaarheid, met een totale doseringsperiode van ten minste vier weken gevolgd door een uitvoerige histopathologie van de mannelijke geslachtsklieren, wordt voldoende geacht om het merendeel van de effecten op de mannelijke vruchtbaarheid en de spermatogenese te kunnen detecteren.

12. De vrouwtjes moeten het hele onderzoek lang de teststof toegediend krijgen. Dit betekent twee weken voorafgaand aan het paren (zodat het onderzoek ten minste twee volledige oestruscycli omvat), de variabele tijd tot conceptie, de duur van de dracht en ten minste dertien dagen na het werpen, tot en met de dag voordat ze worden gedood.

13. De duur van het onderzoek, na acclimatisering en beoordeling van de oestruscyclus voorafgaand aan de behandeling, is afhankelijk van het gedrag van het vrouwtje en beloopt ongeveer 63 dagen (ten minste 14 dagen vóór het paren, (tot) 14 dagen paring, 22 dagen dracht, en ten slotte een zoogperiode van 13 dagen).

14. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks zorgvuldig geobserveerd om tekenen van toxiciteit te ontdekken. Bij dieren die tijdens de testperiode sterven of worden gedood, wordt obductie verricht. Dieren die aan het eind van de test nog in leven zijn, worden gedood en ook hierop wordt obductie verricht.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Keuze van de diersoort

15. Deze testmethode is ontworpen om te worden toegepast met ratten. Indien de in deze testmethode gespecificeerde parameters worden onderzocht bij een andere knaagdiersoort moet dit uitvoerig worden gemotiveerd. In het internationale valideringsprogramma voor de detectie van hormoonontregelaars in OESO TG 407 (die overeenkomt met hoofdstuk B.7 van deze bijlage) zijn alleen ratten gebruikt. Stammen met een lage vruchtbaarheid of waarvan bekend is dat er vaak ontwikkelingsstoornissen optreden, mogen niet worden gebruikt. Er moet gebruikgemaakt worden van gezonde dieren die nog niet eerder gepaard hebben en nog niet eerder aan experimenten zijn onderworpen. Van de proefdieren moeten soort, stam, geslacht, gewicht en leeftijd bekend zijn. Per geslacht mag bij aanvang van het

onderzoek het gewicht van de dieren die worden gebruikt, niet meer dan 20 % van het gemiddelde gewicht afwijken. Wanneer het onderzoek wordt uitgevoerd als voorstudie voor een onderzoek van langere duur of een onderzoek over een volledige generatie, verdient het de voorkeur dat de dieren in beide onderzoeken tot dezelfde stam behoren en dezelfde oorsprong hebben.

Huisvesting en voeding

16. Alle procedures moeten in overeenstemming zijn met de plaatselijke normen voor de verzorging van proefdieren. De temperatuur in de proefdierruimte moet 22 °C (± 3 °) zijn. De relatieve luchtvochtigheid moet ten minste 30 % zijn en (behalve tijdens het schoonmaken van de ruimte) bij voorkeur niet hoger dan 70 % zijn, maar er moet worden gestreefd naar 50-60 %. Verlichting gebeurt met kunstlicht met een fotoperiode van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater. De keuze van het voer kan worden beïnvloed door de noodzaak om voor een afdoende mengbaarheid met de teststof te zorgen, wanneer de stof in het voer wordt toegediend.

17. De dieren moeten in kleine groepen van hetzelfde geslacht worden gehuisvest; de dieren kunnen individueel worden gehuisvest als dat wetenschappelijk gerechtvaardigd is. Indien de dieren in groepen in kooien worden ondergebracht, mogen per kooi niet meer dan vijf dieren worden gehuisvest. Het paren moet plaatsvinden in kooien die voor dat doel geschikt zijn. Drachtige vrouwtjes moeten in aparte kooien worden ondergebracht en nestmateriaal krijgen. Zogende vrouwtjes moeten samen met hun jongen in aparte kooien worden ondergebracht.

18. Het voeder moet regelmatig op verontreinigingen worden onderzocht. Een monster van het voedsel moet worden bewaard totdat het verslag is afgerond.

Voorbereiding van de dieren

19. Gezonde jonge volwassen dieren worden aselect ingedeeld in de controle- en behandelgroepen. De kooien worden zodanig geplaatst dat mogelijke effecten door de plaatsing van de kooi 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.

Voorbereiding van de doses

20. Aanbevolen wordt om de teststof oraal toe te dienen, tenzij andere toedieningswegen geschikter worden geacht. Wanneer voor de orale weg wordt gekozen, wordt de teststof gewoonlijk via een sonde toegediend; als alternatieve mogelijkheid kunnen teststoffen echter ook via het voer of het drinkwater worden toegediend.

21. Waar nodig wordt de teststof in een geschikt vehiculum opgelost of gesuspendeerd. Aanbevolen wordt eerst na te gaan of het mogelijk is een waterige oplossing/suspensie te gebruiken, als dit niet kan een oplossing/emulsie in olie (bv. maïsolie) te overwegen en daarna eventueel andere vehicula. Wanneer een ander vehiculum dan water wordt gebruikt, moeten de toxische kenmerken daarvan bekend zijn. Voorts moeten de stabiliteit en homogeniteit van de teststof in het vehiculum worden bepaald.

PROCEDURE

Aantal en geslacht van de dieren

22. Aanbevolen wordt dat elke groep aan het begin van de test ten minste 10 mannetjes en 12-13 vrouwtjes telt. Bij de vrouwtjes wordt vóór blootstelling de oestruscyclus beoordeeld. Dieren die geen normale 4-5-daagse cyclus hebben, worden niet het onderzoek opgenomen. Daarom wordt aanbevolen met extra vrouwtjes te beginnen om uiteindelijk op 10 vrouwtjes per groep uit te komen. Behalve in geval van duidelijke toxische effecten wordt verwacht dat dit ten minste 8 drachtige vrouwtjes per groep zal opleveren, hetgeen normaal gesproken het minimaal aanvaardbare aantal drachtige vrouwtjes per groep is. Het doel is voldoende drachten en nakomelingen tot stand te brengen om een betekenisvolle evaluatie mogelijk te maken van de mogelijke invloed van de stof op de vruchtbaarheid, de dracht en het gedrag van moeder en jongen, en op de groei en ontwikkeling van de F_1-nakomelingen, vanaf de conceptie tot dag 13 na het werpen.

Dosering

23. In het algemeen zijn drie testgroepen en een controlegroep vereist. De dosisniveaus kunnen worden gebaseerd op informatie uit acute-toxiciteitstests of op de resultaten van onderzoeken bij herhaalde toediening. Afgezien van de toediening van de teststof worden de dieren in de controlegroep op identieke wijze behandeld als de dieren in de testgroepen. Indien bij de toediening van de teststof van een vehiculum gebruik wordt gemaakt, moet dit aan de controlegroep in het hoogste gebruikte volume toegediend worden.

24. De dosisniveaus moeten worden gekozen in het licht van de bestaande gegevens over toxiciteit en (toxico)kinetica. Er moet ook rekening mee gehouden worden dat er verschillen kunnen zijn in gevoeligheid tussen drachtige en niet-drachtige dieren. Het hoogste dosisniveau moet zo worden gekozen dat toxische effecten optreden, maar geen sterfte of ernstig lijden. Daarna moet een dalende reeks dosisniveaus worden gekozen teneinde een eventuele doseringsgerelateerde respons en het laagste dosisniveau waarbij geen schadelijk effect werd vastgesteld (No-Observed Adverse Effect Level, NOAEL) aan te tonen. Intervallen van een factor twee of vier zijn vaak optimaal om de dalende dosisniveaus vast te stellen en het is vaak beter een vierde testgroep toe te voegen dan zeer grote intervallen (bv. meer dan een factor 10) tussen de doseringen te gebruiken.

25. Bij algemene toxiciteit (bv. verminderd lichaamsgewicht, effecten op lever, hart, longen of nieren enz.) of andere veranderingen die mogelijk geen toxische reacties zijn (bv. verminderde voedselinname, leververgroting), moeten de waargenomen effecten op hormoongevoelige eindpunten met de nodige omzichtigheid worden geïnterpreteerd.

Limiettest

26. Als volgens de hier beschreven procedures een onderzoek met orale toediening wordt uitgevoerd met één dosisniveau van ten minste 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag of, in het geval van toediening via het voer of het drinkwater, het equivalente percentage in het voer of het drinkwater, 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 test met meerdere dosisniveaus te doen. De limiettest is bruikbaar, behalve wanneer vanwege de verwachte blootstelling van de mens een hogere orale dosis nodig wordt geacht. Voor andere toedieningsvormen, zoals inhalatie of toediening op de huid, zal de maximaal haalbare concentratie vaak worden bepaald door de fysisch-chemische eigenschappen van de teststoffen.

Toediening van de doses

27. De dieren krijgen de teststof 7 dagen per week dagelijks toegediend. 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 intubatiecanule. Het maximale volume dat in één keer kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het dier. Het volume mag niet groter zijn dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht, behalve wanneer het om een waterige oplossing gaat: in dat geval mag 2 ml/100 g lichaamsgewicht worden gebruikt. Afgezien van irriterende of bijtende teststoffen 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.

28. Het is belangrijk dat er bij een teststof die via het voer of het drinkwater wordt toegediend, voor wordt gezorgd dat de hoeveelheden teststof de normale voer- of waterbalans niet verstoren. Wanneer de teststof in het voer wordt toegediend, kan een constante concentratie in het voer (in ppm) of een constante dosis in verhouding tot het lichaamsgewicht van de dieren worden gebruikt; daarbij moet worden aangegeven welk alternatief is gebruikt. Wanneer de teststof met een sonde wordt toegediend, moeten de doses dagelijks op vaste tijdstippen worden gegeven. De doses moeten ten minste wekelijks worden aangepast om een constant dosisniveau als functie van het lichaamsgewicht van het dier te verkrijgen.

Proefopzet

29. Voor beide geslachten moet de toediening ten minste 2 weken voor het paren beginnen, nadat de dieren ten minste vijf dagen lang zijn geacclimatiseerd en de vrouwtjes gescreend zijn op normale oestruscycli (in een voorbehandelingsperiode van 2 weken). Het onderzoek moet zodanig worden ingepland dat de beoordeling van de oestruscyclus begint kort nadat de dieren volledig geslachtsrijp zijn. Dit kan enigszins variëren voor verschillende rattenstammen in verschillende laboratoria, bv. voor Sprague Dawley-ratten op een leeftijd van 10 weken, voor Wistar-ratten op een leeftijd van ongeveer 12 weken. Moederdieren met jongen moeten op dag 13 na het werpen worden gedood of kort daarna. De dag van de geboorte (d.w.z. wanneer het werpen is voltooid) wordt gedefinieerd als dag 0 na het werpen. Vrouwtjes die geen tekenen van copulatie vertonen, worden 24-26 dagen na de laatste dag van de paringsperiode gedood. Voor beide geslachten wordt de toediening gedurende de paringsperiode voortgezet. Daarna moeten de mannetjes de teststof ten minste nog toegediend krijgen tot de minimale totale doseringsperiode van 28 dagen is afgerond. Vervolgens worden ze gedood of, anders, in leven gehouden en verder behandeld voor een eventuele tweede paring.

30. De dagelijkse toediening aan de moederdieren moet doorgaan gedurende de dracht en ten minste tot en met dag 13 na het werpen of de dag voordat ze gedood worden. Voor onderzoeken waarbij de toediening van de teststof door middel van inhalatie of dermaal plaatsvindt, moet deze ten minste worden voortgezet tot en met dag 19 van de dracht en zo spoedig mogelijk en niet later dan postnatale dag (PND) 4 worden hervat.

31. In aanhangsel 2 wordt de proefopzet in een diagram weergegeven.

De paringsprocedure

32. Normaal gesproken moet men voor dit onderzoek één mannetje met één vrouwtje (1:1) laten paren. Hierop zijn uitzonderingen mogelijk in geval van incidentele sterfte van mannetjes. Het vrouwtje moet bij hetzelfde mannetje worden geplaatst totdat aanwijzingen voor copulatie zijn waargenomen of er twee weken zijn verstreken. Elke ochtend worden de vrouwtjes onderzocht op de aanwezigheid van sperma of vaginale plug. Dag 0 van de dracht wordt gedefinieerd als de dag waarop aanwijzingen voor paring worden bevestigd (observatie van een vaginale plug en/of sperma). Wanneer het paren geen succes heeft, kan worden overwogen de vrouwtjes opnieuw te laten dekken door mannetjes van dezelfde groep waarvan de vruchtbaarheid is aangetoond.

Nestgrootte

33. Op PND 4 kan de grootte van de nesten worden aangepast door eliminatie van extra jongen door willekeurige selectie, zodat elk nest uiteindelijk zoveel mogelijk bestaat uit vier of vijf jongen per geslacht, afhankelijk van de normale nestgrootte van de gebruikte rattenstam. Bij twee van de overtollige jongen moeten bloedmonsters worden afgenomen, gepoold en gebruikt ter bepaling van de serumspiegels van T4. Selectieve eliminatie van

jongen, bijvoorbeeld op grond van lichaamsgewicht of anogenitale afstand (AGD), is niet gepast. Als het door het aantal mannelijke of vrouwelijke jongen niet mogelijk is om op vier of vijf per geslacht per nest uit te komen, is gedeeltelijke aanpassing (bv. zes mannetjes en vier vrouwtjes) aanvaardbaar. Er worden geen jongen geëlimineerd als de nestgrootte daardoor onder de streefgrootte (8 of 10 jongen/nest) zou komen. Als er maar één jong beschikbaar is boven de streefgrootte, wordt er slechts één jong geëlimineerd en gebruikt voor het nemen van een bloedmonster ter bepaling van serum-T4.

34. Als de nestgrootte niet wordt aangepast, worden er op PND 4 twee jongen per nest gedood en worden er bloedmonsters genomen voor het meten van de serumspiegels van schildklierhormonen. De twee jongen per nest moeten zo mogelijk vrouwelijke jongen zijn om de mannelijke jongen te bewaren voor de beoordeling van de tepelretentie, tenzij er na verwijdering van deze jongen geen enkel vrouwtje meer overblijft voor de beoordeling aan het einde van het onderzoek. Er worden geen jongen geëlimineerd als de nestgrootte daardoor onder de 8 of 10 jongen/nest (afhankelijk van de normale nestgrootte van de gebruikte rattenstam) zou komen. Als er maar één jong beschikbaar is boven de normale nestgrootte, wordt er slechts één jong geëlimineerd en gebruikt voor het nemen van een bloedmonster ter bepaling van serum-T4.

Waarnemingen bij levende dieren

Klinische waarnemingen

35. Gedurende de hele testperiode moeten er minstens eenmaal per dag, en vaker als er tekenen van toxiciteit worden waargenomen, algemene klinische waarnemingen worden verricht. Deze moet bij voorkeur elke dag op dezelfde tijd(en) plaatsvinden, rekening houdend met de piekperiode voor de verwachte effecten na de toediening. Met de teststof samenhangende veranderingen in het gedrag, tekenen van een moeilijke of langdurige worp en alle tekenen van toxiciteit, inclusief sterfte, moeten worden vastgelegd, met inbegrip van de aanvang, de ernst en de duur van de toxiciteitsverschijnselen.

Lichaamsgewicht en consumptie van voer en water

36. De mannetjes en vrouwtjes moeten worden gewogen op de eerste dag dat zij de teststof krijgen toegediend, vervolgens ten minste eenmaal per week en aan het einde van het onderzoek. De vrouwtjes moeten worden gewogen op de dagen 0, 7, 14 en 20 tijdens de dracht, binnen 24 uur na de geboorte (dag 0 of 1 na het werpen) en ten minste op de dagen 4 en 13 na het werpen. Deze waarnemingen worden voor elk volwassen dier apart gerapporteerd.

37. Vóór het paren, tijdens de dracht en tijdens het zogen, moet ten minste wekelijks de voerconsumptie worden gemeten. Tijdens de paringsperiode is deze meting facultatief. Wanneer de teststof via het drinkwater wordt toegediend, moet ook de waterconsumptie gedurende deze perioden worden gemeten.

Oestruscycli

38. Voordat de behandeling begint, moeten de oestruscycli worden gecontroleerd om te selecteren op vrouwelijke proefdieren met regelmatige cycli (zie punt 22). Ook moeten er van het begin van de behandelingsperiode totdat paring is gebleken, dagelijks vaginale uitstrijkjes worden onderzocht. Indien vermoed wordt dat effecten van acute stress bij het begin van de behandeling de oestruscyclus zouden kunnen verstoren, kunnen de laboratoria de proefdieren gedurende 2 weken blootstellen en vervolgens ten minste 2 weken lang dagelijks vaginale uitstrijkjes nemen ter controle van de oestruscycli gedurende de periode vóór paring tot in de paringsperiode, totdat paring gebleken is. Wanneer monsters van vaginale/cervicale cellen worden genomen, moet erop worden gelet verstoring van het slijmvlies, die tot schijndracht kan leiden, te voorkomen (7) (8).

Parameters met betrekking tot de nakomelingen

39. De drachttijd moet worden geregistreerd en wordt berekend vanaf dag 0 van de dracht. Elke worp moet zo spoedig mogelijk na de geboorte worden onderzocht, teneinde het aantal en geslacht van de jongen vast te stellen, alsmede het aantal doodgeborenen, levendgeborenen, ondermaatse jongen (jongen die aanmerkelijk kleiner zijn dan de corresponderende controlejongen) en de aanwezigheid van macroscopisch zichtbare afwijkingen.

40. Levende jongen moeten worden geteld en gesekst en de nesten moeten binnen 24 uur na de geboorte (dag 0 of 1 na het werpen) en ten minste op de dagen 4 en 13 na het werpen worden gewogen. Naast de in punt 35 beschreven waarnemingen moet elk afwijkend gedrag van de nakomelingen worden geregistreerd.

41. De AGD van elk jong moet worden gemeten op dezelfde postnatale dag tussen postnatale dag 0 en het einde van postnatale dag 4. Het lichaamsgewicht van elk jong moet worden bepaald op de dag dat de AGD wordt gemeten en de AGD moet genormaliseerd worden tot een maat voor jonggrootte, bij voorkeur de derdemachtswortel van het lichaamsgewicht (9). Het aantal tepels/tepelhoven bij mannelijke jongen moet worden geteld op postnatale dag 12 of 13, zoals aanbevolen in OESO-leidraad 151 (10).

Klinische biochemie

42. Er worden bloedmonsters genomen van een gedefinieerde plaats op basis van het volgende schema:

- van ten minste twee jongen per nest op PND 4 als het aantal jongen dit toelaat (zie de punten 33-34);
- van alle moederdieren en ten minste twee jongen per nest op het tijdstip van doden op dag 13; en
- van alle volwassen mannetjes op het tijdstip van doden.

Alle bloedmonsters worden onder passende omstandigheden bewaard. In de bloedmonsters van de jongen op dag 13 en de volwassen mannetjes worden de serumspiegels van schildklierhormonen (T4) bepaald. Een verdere bepaling van T4 in bloedmonsters van moederdieren en jongen op dag 4 wordt verricht indien relevant. Eventueel kunnen ook andere hormonen worden gemeten indien relevant. Voor de schildklierhormoonanalyse kan bloed van jongen per nest gepoold worden. De schildklierhormonen (T4 en TSH) worden bij voorkeur als "totaal" gemeten.

43. De volgende factoren kunnen van invloed zijn op de variabiliteit en de absolute concentraties van de hormoonbepalingen:

- tijdstip waarop de dieren worden gedood, vanwege de schommelingen in de hormoonconcentraties gedurende de dag;
- wijze waarop de dieren worden gedood: onnodige stress bij de dieren, waardoor de hormoonconcentraties kunnen worden beïnvloed, moet worden voorkomen;
- testkits voor hormoonbepalingen, die verschillende standaardkrommen kunnen hebben.

44. Plasmamonsters die specifiek voor hormoonbepaling zijn bedoeld, moeten telkens op hetzelfde moment van de dag worden genomen. De verschillende in de handel verkrijgbare "assay kits" kunnen verschillende numerieke waarden opleveren bij de analyse van hormoonconcentraties.

Pathologie

Macroscopische obductie

45. Op het tijdstip waarop ze worden gedood of tijdens het onderzoek sterven, worden de dieren macroscopisch onderzocht op afwijkingen of pathologische veranderingen. Bijzondere aandacht moet worden geschonken aan de organen van het voortplantingssysteem. Het aantal implantatieplaatsen moet worden geregistreerd. In de ochtend van de dag van obductie moeten er vaginale uitstrijkjes onderzocht worden om de fase van de oestruscyclus te bepalen en deze in verband te kunnen brengen met de histopathologie van de eierstokken.

46. De testes en epididymides, evenals de prostaat en de zaadblaasjes met coagulans afscheidende klieren als geheel van alle volwassen mannetjes moeten zo nodig worden ontdaan van aanhechtend weefsel en zo spoedig mogelijk na de sectie nat worden gewogen om te voorkomen dat ze uitdrogen. Optionele organen die eventueel ook gewogen kunnen worden, zijn onder meer het m levator ani plus bulbocavernosuscomplex, de Cowperse klieren en de glans penis bij mannetjes en de gepaarde ovaria (nat gewicht) en uterus (inclusief cervix) bij vrouwtjes; indien deze gewichten worden meegenomen, moeten ze zo snel mogelijk na de sectie worden opgenomen.

47. Dode jongen en jongen die op dag 13 na het werpen, of kort daarna, zijn gedood, moeten in elk geval uitwendig zorgvuldig worden onderzocht op macroscopisch zichtbare

afwijkingen. Daarbij wordt met name gelet op de uitwendige voortplantingsorganen, die op tekenen van een afwijkende ontwikkeling worden onderzocht. Op dag 13 moet van 1 mannelijk en 1 vrouwelijk jong per nest de schildklier worden geconserveerd.

48. Van alle volwassen dieren moeten de ovaria, testes, secundaire geslachtsorganen (uterus en cervix, epididymides, prostaat, zaadblaasjes met coagulans uitscheidende klieren), schildklier en alle organen die macroscopische letsels vertonen, worden geconserveerd. Voor routineonderzoek van testes en epididymides wordt fixatie in formaline niet aanbevolen. Voor deze weefsels is het gebruik van Bouin's fixatief of gemodificeerde Davidson-oplossing een aanvaardbare methode (11). De tunica albuginea kan voorzichtig en ondiep met een naald worden ingeprikt op de beide polen van het orgaan, zodat het fixatief snel kan binnendringen.

Histopathologie

49. De ovaria, testes en epididymides van de dieren in de hoogste dosisgroep en de controlegroep moeten aan een uitvoerig histologisch onderzoek worden onderworpen (met speciale aandacht voor de stadia van de spermatogenese en de histopathologie van de interstitiële testiculaire celstructuur). De overige geconserveerde organen, waaronder de schildklier van jongen en van volwassen dieren, kunnen worden onderzocht indien nodig. Het gewicht van de schildklier kan na de fixatie worden bepaald. Aanhechtend weefsel moet zeer voorzichtig en pas na fixatie worden verwijderd, om beschadiging van de weefsels te voorkomen. Weefselbeschadigingen kunnen de histopathologische analyse negatief beïnvloeden. Wanneer er veranderingen worden waargenomen in de groep met de hoogste dosering, moeten ook de dieren in de andere doseringsgroepen worden onderzocht. In de richtsnoeren voor histopathologisch onderzoek (11) zijn nadere gegevens opgenomen over de sectie, de fixatie, het snijden van coupes en de histopathologie van endocriene weefsels.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

50. Er worden voor elk dier apart gegevens verstrekt. Daarnaast moeten alle gegevens worden samengevat in tabelvorm, waarbij voor elke testgroep worden vermeld: het aantal dieren aan het begin van de test, het aantal dieren dat tijdens de test dood is aangetroffen of met het oog op een humane behandeling is gedood, het tijdstip van sterfte of humane doding, het aantal vruchtbare dieren, het aantal drachtige vrouwtjes, het aantal dieren met toxiciteitsverschijnselen, een beschrijving van de waargenomen toxiciteitsverschijnselen met vermelding van de aanvang, de duur en de ernst van de toxische effecten, de aard van de histopathologische veranderingen en alle relevante gegevens over de nesten. In aanhangsel 3 is een opzet van een overzichtstabel opgenomen die heel praktisch is gebleken voor de beoordeling van effecten op de voortplanting en de ontwikkeling.

51. Vanwege de beperkte omvang van het onderzoek, zijn statistische analyses in de vorm van toetsen voor "significantie" voor veel eindpunten, vooral die in verband met de voortplanting, van beperkte waarde. Als er statistische analyses worden gebruikt, moeten de gekozen methoden geschikt zijn voor de verdeling van de onderzochte variabele en moeten ze vóór de start van het onderzoek worden gekozen. De statistische analyse van de AGD en de tepelretentie moet worden gebaseerd op de gegevens voor afzonderlijke jongen, waarbij rekening wordt gehouden met nesteffecten. Waar passend is het nest de analyse-eenheid. De statistische analyse van lichaamsgewicht van de jongen moet worden gebaseerd op de gegevens voor afzonderlijke jongen, waarbij rekening wordt gehouden met nestgrootte. Vanwege de geringe groepsgrootte kan het ook nuttig zijn om gebruik te maken van historische controlegegevens (bv. voor nestgrootte), indien beschikbaar, ter ondersteuning van de interpretatie van het onderzoek.

Evaluatie van de resultaten

52. De resultaten van dit toxiciteitsonderzoek worden beoordeeld aan de hand van de waargenomen effecten en de resultaten van de obductie en het microscopisch onderzoek. De beoordeling omvat het verband tussen de dosis van de teststof en de aanwezigheid of afwezigheid, de frequentie en de ernst van afwijkingen zoals macroscopisch letsel, gespecificeerde doelorganen, onvruchtbaarheid, klinische afwijkingen, aantasting van de reproductie- en nestresultaten, veranderingen in het lichaamsgewicht, effecten op de mortaliteit en andere toxische effecten.

53. Vanwege de korte behandelperiode van de mannetjes moeten bij de beoordeling van effecten op de voortplanting bij mannetjes niet alleen de vruchtbaarheidsgegevens, maar ook de histopathologie van de testes en de epididymides in aanmerking worden genomen. Ook het gebruik van historische controlegegevens over voortplanting/ontwikkeling (bv. voor nestgrootte, AGD, tepelretentie, T4-serumspiegels), indien beschikbaar, kan nuttig zijn ter ondersteuning van de interpretatie van het onderzoek.

54. Voor de kwaliteitscontrole wordt voorgesteld historische controlegegevens te verzamelen en variatiecoëfficiënten te berekenen voor numerieke gegevens, met name voor de parameters die verband houden met het opsporen van hormoonontregelaars. Deze gegevens kunnen voor vergelijkingsdoeleinden worden gebruikt wanneer daadwerkelijk uitgevoerd onderzoek wordt geëvalueerd.

Testverslag

55. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

- bron, partijnummer, uiterste gebruiksdatum, indien beschikbaar;
- stabiliteit van de teststof, indien bekend.

Stof die uit één component bestaat:

- fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water en aanvullende relevante fysisch-chemische eigenschappen;
- chemische identificatiegegevens, zoals IUPAC- of CAS-naam, CAS-nummer, SMILES- of InChI-code, structuurformule, zuiverheid, chemische identiteit van onzuiverheden, indien van toepassing en praktisch haalbaar enz.

Stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB's en mengsels:

- voor zover mogelijk, karakterisering aan de hand van chemische identiteit (zie hierboven), kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen van de bestanddelen.

Vehiculum (indien van toepassing):

- motivering voor de keuze van het vehiculum, indien geen water wordt gebruikt.

Proefdieren:

- gebruikte soort/stam;
- aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;
- herkomst, leefomstandigheden, voeding enz.;
- gewicht van elk dier aan het begin van de test;
- motivering voor het gebruik van een ander soort dan ratten.

Testomstandigheden:

- achtergrond voor de keuze van de dosisniveaus;
- gedetailleerde gegevens over de formulering van de teststof, de bereiding van het voer en de bereikte concentratie, stabiliteit en homogeniteit van het preparaat;
- gedetailleerde gegevens over de toediening van de teststof;
- omrekening van de concentratie van de teststof in het voer/drinkwater (in ppm) naar de feitelijke dosis (in mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing;
- gedetailleerde gegevens over de kwaliteit van het voer en het water;
- gedetailleerde beschrijving van de randomisatieprocedure voor de selectie van te ruimen jongen, indien van toepassing.

Resultaten:

- lichaamsgewicht en veranderingen in het lichaamsgewicht;
- indien beschikbaar, voedselverbruik en waterverbruik;

- gegevens over de toxische reactie naar geslacht en dosis, met inbegrip van vruchtbaarheid, dracht en andere gegevens over toxiciteit;
- duur van de dracht;
- toxische of andere effecten op de reproductie, de jongen, de postnatale groei enz.;
- aard, ernst en duur van (al dan niet reversibele) klinische waarnemingen;
- aantal volwassen vrouwtjes met een normale of abnormale oestruscyclus en cyclusduur van deze vrouwtjes;
- aantal levend geboren jongen en verliezen na implantatie;
- gegevens over het lichaamsgewicht van jongen;
- AGD van alle jongen (en lichaamsgewicht op de dag van de AGD-meting);
- tepelretentie bij mannelijke jongen;
- schildklierhormoonspiegels bij dag 13-jongen en volwassen mannetjes (en moederdieren en dag 4-jongen indien gemeten);
- aantal jongen met macroscopisch zichtbare afwijkingen, macroscopische beoordeling van de uitwendige geslachtsorganen, aantal ondermaatse jongen;
- tijdstip van sterfte tijdens het onderzoek en of de dieren overleefden tot het einde van het onderzoek;
- aantal implantaties, nestgrootte en nestgewichten op het moment van registratie;
- lichaamsgewicht bij het doden van de dieren en gegevens over het gewicht van organen voor de ouderdieren;
- obductiebevindingen;
- een gedetailleerde beschrijving van histopathologische bevindingen;
- resorptiegegevens (indien beschikbaar);
- een statistische behandeling van de resultaten, indien van toepassing.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

Interpretatie van resultaten

56. Op basis van dit onderzoek kan de reproductie-/ontwikkelingstoxiciteit worden beoordeeld bij de toediening van herhaalde doses (zie de punten 5 en 6). Het onderzoek zou een indicatie kunnen geven of verder onderzoek nodig is en biedt oriëntatiepunten voor de opzet van vervolgonderzoeken. OESO-leidraad nr. 43 moet worden geraadpleegd voor hulp bij de interpretatie van resultaten op het gebied van reproductie- en

ontwikkelingstoxiciteit (12). In OESO-leidraad nr. 106 over de histologische beoordeling van endocriene en voortplantingstests bij knaagdieren (11) is informatie te vinden over het prepareren en beoordelen van (endocriene) organen en vaginale uitstrijkjes, die van nut kan zijn voor deze TG.

LITERATUUR

(1) OESO (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Op aanvraag verkrijgbaar bij de Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(2) OESO (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Op aanvraag verkrijgbaar bij de Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(3) OESO (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Op aanvraag verkrijgbaar bij de Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(4) OESO (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(5) OESO (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(6) OESO (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.

(8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(9) Gallavan R.H. Jr , Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L..(1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(10) OESO (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(11) OESO (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 106), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(12) OESO (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

Aanhangsel 1

DEFINITIES (ZIE OOK OESO-LEIDRAAD 150 (6))

Androgene werking: het vermogen van een chemische stof om in een zoogdierorganisme als een natuurlijk androgeen hormoon (bv. testosteron) te werken.

Antiandrogene werking: het vermogen van een chemische stof om in een zoogdierorganisme de werking van een natuurlijk androgeen hormoon (bv. testosteron) te onderdrukken.

Antioestrogene werking: het vermogen van een chemische stof om in een zoogdierorganisme de werking van een natuurlijk oestrogeen hormoon (bv. 17β-oestradiol) te onderdrukken.

Antithyreoïde werking: het vermogen van een chemische stof om in een zoogdierorganisme de werking van een natuurlijk schildklierhormoon (bv. T_3) te onderdrukken.

Chemische stof: een stof of mengsel.

Dosering: een algemene term die de dosis, de frequentie en de duur van de toediening omvat.

Dosis: de toegediende hoeveelheid teststof. De dosis wordt uitgedrukt als gewicht van de teststof per eenheid lichaamsgewicht van het proefdier per dag (bv. mg/kg lichaamsgewicht/dag), of als constante voedingsconcentratie.

Manifeste toxiciteit: een algemene term die duidelijke toxiciteitsverschijnselen beschrijft die optreden na de toediening van de teststof. Deze verschijnselen moeten een beoordeling van de gevaren 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.

Maternale toxiciteit: schadelijke effecten bij drachtige vrouwtjes, die hetzij specifiek optreden (direct effect), hetzij niet-specifiek (indirect effect).

NOAEL: afkorting van "no-observed-adverse-effect level", het niveau waarbij geen schadelijk effect werd vastgesteld. Dit is het hoogste dosisniveau waarbij nog geen aan de behandeling gebonden nadelige effecten worden vastgesteld.

Oestrogene werking: het vermogen van een chemische stof om in een zoogdierorganisme als een natuurlijk oestrogeen hormoon (bv. 17β-oestradiol) te werken.

Ontwikkelingstoxiciteit: de wijze waarop reproductietoxiciteit zich manifesteert, in de vorm van pre-, peri- en postnatale, structurele of functionele afwijkingen bij nakomelingen.

Reproductietoxiciteit: schadelijke effecten op de nakomelingen en/of verstoring van de

voortplantingsfuncties of het voortplantingsvermogen bij mannetjes en vrouwtjes.

Teststof: elke volgens deze testmethode getest(e) stof of mengsel.

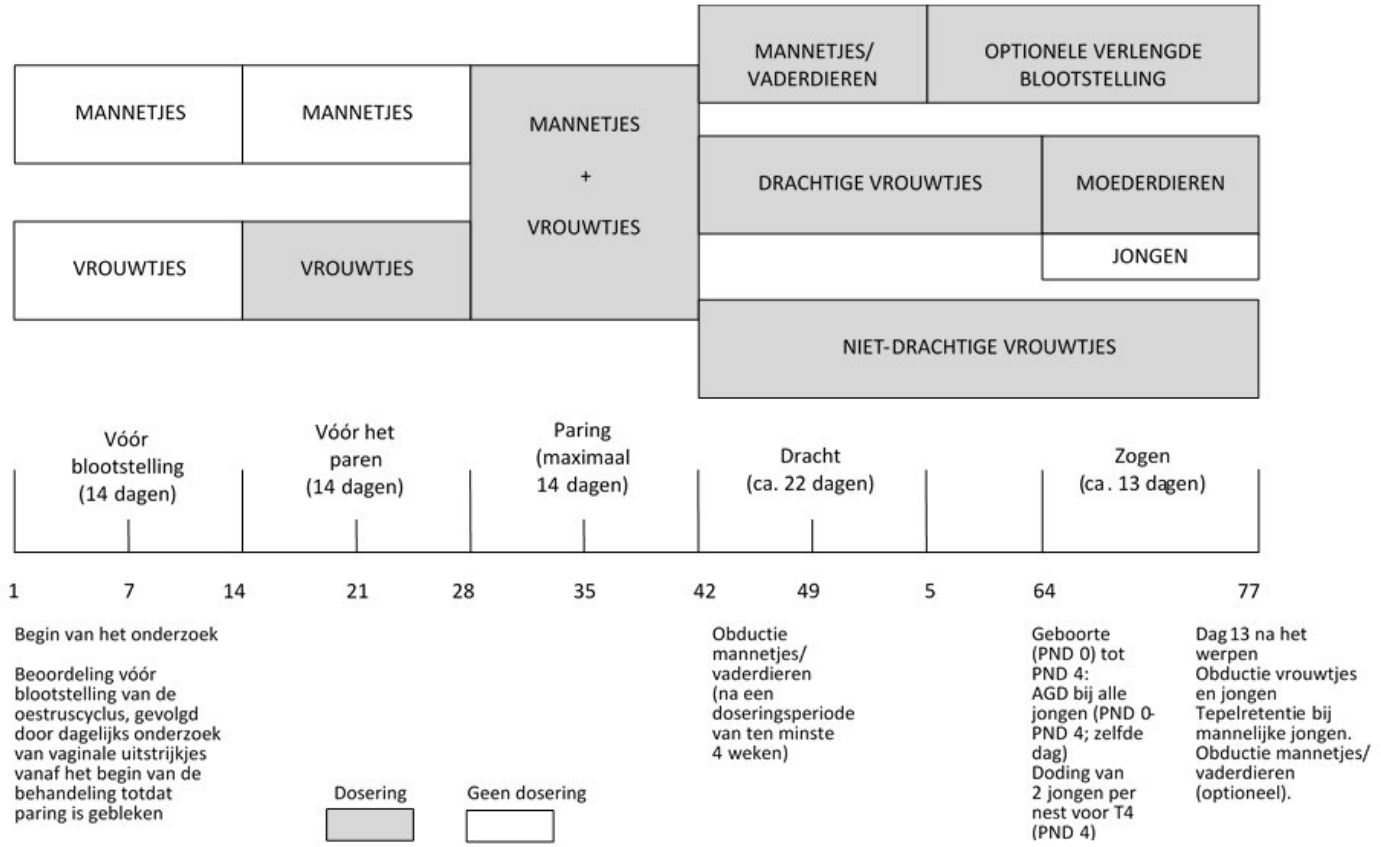
Thyreoïde werking: het vermogen van een chemische stof om in een zoogdierorganisme als een natuurlijk schildklierhormoon (bv. T_3) te werken.

Validering: een wetenschappelijke methode die erop gericht is om de operationele vereisten en beperkingen van een testmethode te beschrijven en de betrouwbaarheid en relevantie ervan voor een bepaald doel aan te tonen.

Verstoring van de vruchtbaarheid: afwijkingen in de voortplantingsfuncties of het voortplantingsvermogen bij mannetjes of vrouwtjes.

Aanhangsel 2

DIAGRAM VAN DE PROEFOPZET MET DE MAXIMALE ONDERZOEKSDUUR OP BASIS VAN EEN VOLLEDIGE 14-DAAGSE PARINGSPERIODE



Aanhangsel 3

OVERZICHTSTABEL VAN DE EFFECTEN OP REPRODUCTIE/ONTWIKKELING

WAARNEMINGEN	**WAARDEN**				
Dosering (eenheden)	**0 (controle)**	**. . .**	**. . .**	**. . .**	**. . .**
Paren bij begin (N)					
Oestruscyclus (ten minste gemiddelde duur en frequentie van onregelmatige cycli)					
Vrouwtjes met aanwijzingen voor copulatie (N)					
Vrouwtjes die drachtig worden (N)					
Dagen conceptie 1 - 5 (N)					
Dagen conceptie 6 - . . .[(1)] (N)					
Dracht ≤ 21 dagen (N)					
Dracht = 22 dagen (N)					
Dracht ≥ 23 dagen (N)					
Moederdieren met levend geboren jongen (N)					
Moederdieren met levende jongen op postnatale dag 4 (N)					
Implantaten/moederdier (gemiddeld)					
Levende jongen/moederdier bij geboorte (gemiddeld)					
Levende jongen/moederdier op dag 4 (gemiddeld)					
Geslachtsverhouding (m/v) bij geboorte (gemiddeld)					
Geslachtsverhouding (m/v) op dag 4 (gemiddeld)					
Gewicht van het nest bij geboorte (gemiddeld)					
Gewicht van het nest op dag 4 (gemiddeld)					
Gewicht van de jongen bij geboorte (gemiddeld)					

[(1)] laatste dag paringsperiode

Gewicht van de jongen op het moment van AGD-meting (gemiddeld bij mannetjes, gemiddeld bij vrouwtjes)					
AGD jongen op dezelfde postnatale dag, geboorte - dag 4 (gemiddeld bij mannetjes, gemiddeld bij vrouwtjes)					
Gewicht van de jongen op dag 4 (gemiddeld)					
Tepelretentie bij mannelijke jongen op dag 13 (gemiddeld)					
Gewicht van de jongen op dag 13 (gemiddeld)					
AFWIJKENDE JONGEN					
Moederdieren met 0					
Moederdieren met 1					
Moederdieren met ≥ 2					
VERLIES VAN NAKOMELINGEN					
Vóór geboorte/na implantatie (implantaties minus levend geborenen)					
Vrouwtjes met 0					
Vrouwtjes met 1					
Vrouwtjes met 2					
Vrouwtjes met ≥ 3					
Na geboorte (levend geboren en minus levende jongen op PND 13)					
Vrouwtjes met 0					
Vrouwtjes met 1					
Vrouwtjes met 2					
Vrouwtjes met ≥ 3					

B.64 TOXICITEITSONDERZOEK BIJ HERHAALDE TOEDIENING IN COMBINATIE MET DE SCREENINGTEST VOOR REPRODUCTIE/ONTWIKKELINGSTOXICITEIT

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 422 (2016) van de OESO. OESO-richtlijnen voor het testen van chemische stoffen worden periodiek in het licht van de wetenschappelijke vorderingen getoetst. De oorspronkelijke screeningtestrichtlijn 422 werd vastgesteld in 1996 op basis van een protocol voor een gecombineerde screeningtest voor toxiciteit bij herhaalde toediening en reproductie/ontwikkelingstoxiciteit (Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Screening Test) die was besproken op twee bijeenkomsten van deskundigen, in 1990 in Londen (1) en in 1992 in Tokyo (2).

2. Deze testmethode combineert een screeninggedeelte voor reproductie-/ontwikkelingstoxiciteit, gebaseerd op de ervaring die in de aangesloten landen is opgedaan bij het gebruik van de oorspronkelijke methode op bestaande chemische stoffen met een hoog productievolume en in verkennende tests met positieve controlestoffen (3) (4), en een gedeelte voor toxiciteit bij herhaalde toediening, in overeenstemming met OESO-testrichtlijn 407 (toxiciteitsonderzoek (oraal) op knaagdieren bij herhaalde toediening (28 dagen), overeenkomend met hoofdstuk B.7 van deze bijlage).

3. Deze testmethode is bijgewerkt met eindpunten die relevant zijn voor hormoonontregelaars, naar aanleiding van de prioritaire actie die de OESO in 1998 is gestart om bestaande testrichtlijnen te herzien en nieuwe testrichtlijnen te ontwikkelen voor het screenen en testen op potentiële hormoonontregelaars (5). In dit verband werd TG 407 (overeenkomend met hoofdstuk B.7 van deze bijlage) in 2008 uitgebreid met parameters die geschikt zijn om de endocriene activiteit van de teststoffen te detecteren. Met de bijwerking van TG 422 werd beoogd om in screeningtestrichtlijnen een aantal voor hormoonontregelaars relevante eindpunten op te nemen, waarbij de blootstellingsperioden bepaalde gevoelige perioden in de ontwikkeling (prenatale en vroeg-postnatale perioden) beslaan.

4. De aanvullende, voor hormoonontregelaars relevante eindpunten die werden geselecteerd en die ook deel uitmaken van TG 443 (uitgebreid onderzoek naar reproductietoxiciteit over één generatie, overeenkomend met hoofdstuk B.56 van deze bijlage), werden in TG 422 opgenomen op basis van een haalbaarheidsstudie waarin wetenschappelijke en technische vragen met betrekking tot de opname ervan werden onderzocht, alsook aanpassingen van de testopzet die eventueel voor de opname ervan noodzakelijk zouden zijn (6).

5. Deze testmethode is ontworpen voor het verkrijgen van beperkte informatie over de effecten van een teststof op het mannelijke en vrouwelijke voortplantingsvermogen, zoals de gonadale functie, paringsgedrag, conceptie, ontwikkeling van de vrucht en geboorte.

Deze testmethode is geen alternatief noch een vervanging voor de bestaande testmethoden B.31, B.34, B.35 of B.56.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

6. Bij de bepaling en evaluatie van de toxische eigenschappen van een teststof moet aan de hand van acute-toxiciteitstests eerst informatie over de toxiciteit worden verkregen. Daarna kan de orale toxiciteit door middel van herhaalde toediening worden bepaald. Dit onderzoek geeft informatie over mogelijke gevaren voor de gezondheid die zich kunnen voordoen bij herhaalde blootstelling gedurende een betrekkelijk beperkte tijd. De methode omvat het basale toxiciteitsonderzoek bij herhaalde toediening dat kan worden gebruikt voor stoffen waarvoor een onderzoek van 90 dagen niet gerechtvaardigd is (bv. als het productievolume binnen bepaalde grenzen blijft), of als voorstudie voor een langetermijnonderzoek. Bij het uitvoeren van het onderzoek moeten de richtsnoeren en overwegingen worden gevolgd die worden beschreven in de OESO-leidraad nr. 19 over het herkennen, beoordelen en gebruiken van klinische verschijnselen als humane eindpunten voor proefdiergebruik bij veiligheidsbeoordelingen (7).

7. De methode omvat bovendien een screeningtest voor reproductie-/ontwikkelingstoxiciteit en kan daarom ook worden gebruikt om oriënterende gegevens te verkrijgen over mogelijke effecten op het mannelijke en vrouwelijke voortplantingsvermogen, zoals de gonadale functie, paringsgedrag, conceptie, ontwikkeling van de vrucht en geboorte, hetzij in een vroeg stadium van de beoordeling van de toxicologische eigenschappen van teststoffen hetzij voor teststoffen waarbij dergelijke effecten worden vermoed. Deze testmethode verschaft geen volledige informatie over alle aspecten van reproductie en ontwikkeling. Met name voor het detecteren van postnatale gevolgen van prenatale blootstelling of effecten die tijdens postnatale blootstelling zijn veroorzaakt, is de informatie die deze methode oplevert slechts beperkt. Als gevolg van (onder andere) de selectiviteit van de eindpunten en de korte onderzoeksduur kan met deze methode geen bewijs worden verkregen om definitief te concluderen dat een stof geen effecten veroorzaakt op de voortplanting en ontwikkeling. Als er verder geen gegevens zijn uit andere tests op reproductie-/ontwikkelingstoxiciteit, zijn positieve resultaten evenwel nuttig voor een eerste gevarenbeoordeling en kunnen ze als basis dienen voor beslissingen over de noodzaak en timing van aanvullende tests.

8. De resultaten die worden verkregen met de parameters die met het endocriene systeem te maken hebben, moeten worden gezien in samenhang met het conceptueel kader van de OESO voor het testen en beoordelen van hormoonontregelende stoffen (8). In dit conceptueel kader is de uitgebreide TG 422 van de OESO ondergebracht in niveau 4 als een in-vivobepaling waarmee gegevens kunnen worden verkregen over schadelijke effecten op eindpunten die relevant zijn voor het endocrien systeem. Een endocrien signaal

hoeft op zichzelf echter niet als voldoende bewijs te worden beschouwd dat de teststof een hormoonontregelaar is.

9. Bij deze testmethode ligt het accent ook op neurologische effecten als specifiek eindpunt. Benadrukt moet worden dat het noodzakelijk is de dieren zorgvuldig klinisch te observeren om zoveel mogelijk informatie te verzamelen. Ze moet het mogelijk maken potentieel neurotoxische chemicaliën te identificeren, die in dit opzicht nader verdienen te worden onderzocht. Bovendien kan de methode een ruwe indicatie geven van immunologische effecten.

10. Als er geen gegevens zijn uit andere onderzoeken naar systemische toxiciteit, reproductie-/ontwikkelingstoxiciteit, neurotoxiciteit en/of immutoxiciteit, zijn positieve resultaten bovendien nuttig voor een eerste gevarenbeoordeling en kunnen ze als basis dienen voor beslissingen over de noodzaak en timing van aanvullende tests. De test kan vooral nuttig zijn als onderdeel van de Screening Information Data Set (SIDS) van de OESO voor de beoordeling van bestaande chemische stoffen waarvoor weinig of geen toxicologische gegevens beschikbaar zijn, en kan als alternatief dienen voor het uitvoeren van twee aparte tests voor respectievelijk toxiciteit bij herhaalde toediening (OSEO-TG 407, die overeenkomt met hoofdstuk B.7 van deze bijlage) en reproductie-/ontwikkelingstoxiciteit (OSEO-TG 421, die overeenkomt met hoofdstuk B.63 van deze bijlage). De test kan ook worden gebruikt als bereikbepalingsonderzoeken voor uitvoeriger onderzoeken naar reproductie-/ontwikkelingstoxiciteit, of wanneer het gebruik ervan anderszins relevant wordt geacht.

11. In het algemeen wordt aangenomen dat er verschillen in gevoeligheid zijn tussen drachtige en niet-drachtige dieren. In deze gecombineerde test kan het dan ook moeilijker zijn om dosisniveaus te bepalen die geschikt zijn voor zowel de beoordeling van algemene systemische toxiciteit als specifieke reproductie-/ontwikkelingstoxiciteit, ten opzichte van de situatie waarin de afzonderlijke tests apart worden uitgevoerd. Bovendien kunnen de testresultaten voor algemene systemische toxiciteit moeilijker te interpreteren zijn dan wanneer een apart onderzoek bij herhaalde toediening wordt uitgevoerd, vooral wanneer de serum- en histopathologieparameters in het onderzoek niet tegelijkertijd worden beoordeeld. Vanwege de technische complexiteit vergt de uitvoering van deze gecombineerde screeningtest ruime ervaring met testen op toxiciteit. Anderzijds kan de gecombineerde test, afgezien van het geringere aantal dieren dat nodig is, een beter middel bieden om rechtstreekse effecten op voorplanting/ontwikkeling te onderscheiden van effecten die voortvloeien uit andere (systemische) effecten.

12. In deze test is de doseringsperiode langer dan in een klassiek 28-daags onderzoek bij herhaalde toediening. Er zijn echter minder dieren van elk geslacht per groep nodig dan wanneer een klassiek 28-daags onderzoek bij herhaalde toediening wordt uitgevoerd naast een screeningtest voor reproductie/ontwikkelingstoxiciteit.

13. Bij deze testmethode wordt aangenomen dat de teststof oraal wordt toegediend. Als andere blootstellingsroutes worden gebruikt, moet de methode mogelijk worden aangepast.

14. Voordat de testmethode wordt gebruikt op een mengsel om gegevens te genereren voor een beoogd regelgevingsdoel, moet worden nagegaan of, en zo ja, waarom deze methode betrouwbare resultaten oplevert voor dat doel. Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is.

15. De gebruikte definities zijn opgenomen in aanhangsel 1.

PRINCIPE VAN DE TEST

16. De teststof wordt in geleidelijk oplopende doseringen aan verschillende groepen mannetjes en vrouwtjes toegediend. De mannetjes moeten ten minste vier weken lang de teststof toegediend krijgen, tot en met de dag voordat ze worden gedood (inclusief twee weken voorafgaand aan het paren, tijdens de paringsperiode en ongeveer twee weken na het paren). Gezien de beperkte doseringsperiode voor het paren, is de vruchtbaarheid mogelijk geen bijzonder gevoelige indicator voor testiculaire toxiciteit. Een uitvoerig histologisch onderzoek van de testes is daarom noodzakelijk. De combinatie van een twee weken durende doseringsperiode voor het paren, gevolgd door waarnemingen op het gebied van paring/vruchtbaarheid, met een totale doseringsperiode van ten minste vier weken gevolgd door een uitvoerige histopathologie van de mannelijke geslachtsklieren, wordt voldoende geacht om het merendeel van de effecten op de mannelijke vruchtbaarheid en de spermatogenese te kunnen detecteren.

17. De vrouwtjes moeten het hele onderzoek lang de teststof toegediend krijgen. Dit betekent twee weken voorafgaand aan het paren (zodat het onderzoek ten minste twee volledige oestruscycli omvat), de variabele tijd tot conceptie, de duur van de dracht en ten minste dertien dagen na het werpen, tot en met de dag voordat ze worden gedood.

18. De duur van het onderzoek, na acclimatisering en beoordeling van de oestruscyclus voorafgaand aan de behandeling, is afhankelijk van het gedrag van het vrouwtje en beloopt ongeveer 63 dagen (ten minste 14 dagen vóór het paren, (tot) 14 dagen paring, 22 dagen dracht, en ten slotte een zoogperiode van 13 dagen).

19. 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 gedood, wordt obductie verricht. Dieren die aan het eind van het onderzoek nog in leven zijn, worden gedood en ook hierop wordt obductie verricht.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Keuze van de diersoort

20. Deze testmethode is ontworpen om te worden toegepast met ratten. Indien de in TG 422 gespecificeerde parameters worden onderzocht bij een andere knaagdiersoort moet dit uitvoerig worden gemotiveerd. In het internationale valideringsprogramma voor de detectie van hormoonontregelaars voor TG 407 zijn alleen ratten gebruikt. Stammen met een lage vruchtbaarheid of waarvan bekend is dat er vaak ontwikkelingsstoornissen optreden, mogen niet worden gebruikt. Er moet gebruikgemaakt worden van gezonde dieren die nog niet eerder gepaard hebben en nog niet eerder aan experimenten zijn onderworpen. Van de proefdieren moeten soort, stam, geslacht, gewicht en leeftijd bekend zijn. Per geslacht mag bij aanvang van het onderzoek het gewicht van de dieren die worden gebruikt, niet meer dan ± 20 % van het gemiddelde gewicht afwijken. Wanneer het onderzoek wordt uitgevoerd als voorstudie voor een onderzoek van langere duur of een onderzoek over een volledige generatie, verdient het de voorkeur dat de dieren in beide onderzoeken tot dezelfde stam behoren en dezelfde oorsprong hebben.

Huisvesting en voeding

21. Alle procedures moeten in overeenstemming zijn met de plaatselijke normen voor de verzorging van proefdieren. De temperatuur in de proefdierruimte moet 22 °C (± 3 °C) zijn. De relatieve luchtvochtigheid moet ten minste 30 % bedragen en mag, behalve tijdens het schoonmaken van de ruimte, bij voorkeur niet hoger zijn dan 70 %. Verlichting gebeurt met kunstlicht met een fotoperiode van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater. De keuze van het voer kan worden beïnvloed door de noodzaak om voor een afdoende mengbaarheid met de teststof te zorgen, wanneer de stof in het voer wordt toegediend.

22. De dieren moeten in kleine groepen van hetzelfde geslacht worden gehuisvest; de dieren kunnen individueel worden gehuisvest als dat wetenschappelijk gerechtvaardigd is. Indien de dieren in groepen in kooien worden ondergebracht, mogen per kooi niet meer dan vijf dieren worden gehuisvest. Het paren moet plaatsvinden in kooien die voor dat doel geschikt zijn. Drachtige vrouwtjes moeten in aparte kooien worden ondergebracht en nestmateriaal krijgen. Zogende vrouwtjes moeten samen met hun jongen in aparte kooien worden ondergebracht.

23. Het voeder moet regelmatig op verontreinigingen worden onderzocht. Een monster van het voedsel moet worden bewaard totdat het verslag is afgerond.

Voorbereiding van de dieren

24. Gezonde jonge volwassen dieren worden gerandomiseerd en in de behandelgroepen en kooien ingedeeld. De kooien worden zodanig geplaatst dat mogelijke effecten door de plaatsing van de kooi 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.

Voorbereiding van de doses

25. Aanbevolen wordt om de teststof oraal toe te dienen, tenzij andere toedieningswegen geschikter worden geacht. Wanneer voor de orale weg wordt gekozen, wordt de teststof gewoonlijk via een sonde toegediend; als alternatieve mogelijkheid kunnen teststoffen echter ook via het voer of het drinkwater worden toegediend.

26. Waar nodig wordt de teststof in een geschikt vehiculum opgelost of gesuspendeerd. Aanbevolen wordt eerst te bezien of het mogelijk is een waterige oplossing/suspensie te gebruiken, als dit niet kan een oplossing/suspensie in olie (bv. maïsolie) te overwegen en daarna eventueel andere vehicula. Van niet-waterige vehicula moeten de toxische kenmerken bekend zijn. Voorts moeten de stabiliteit en homogeniteit van de teststof in het vehiculum worden bepaald.

PROCEDURE

Aantal en geslacht van de dieren

27. Aanbevolen wordt dat elke groep aan het begin van de test ten minste 10 mannetjes en 12-13 vrouwtjes telt. Bij de vrouwtjes wordt vóór blootstelling de oestruscyclus beoordeeld. Dieren die geen normale 4-5-daagse cyclus hebben, worden niet het onderzoek opgenomen. Daarom wordt aanbevolen met extra vrouwtjes te beginnen om uiteindelijk op 10 vrouwtjes per groep uit te komen. Behalve in geval van duidelijke toxische effecten wordt verwacht dat dit ten minste 8 drachtige vrouwtjes per groep zal opleveren, hetgeen normaal gesproken het minimaal aanvaardbare aantal drachtige vrouwtjes per groep is. Het doel is voldoende drachten en nakomelingen tot stand te brengen om een betekenisvolle evaluatie mogelijk te maken van de mogelijke invloed van de stof op de vruchtbaarheid, de dracht en het gedrag van moeder en jongen, en op de groei en ontwikkeling van de F_1-nakomelingen, vanaf de conceptie tot dag 13 na het werpen. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal dieren worden verhoogd met het aantal dat tussentijds zal worden gedood. Er moet worden overwogen een aanvullende satellietgroep van vijf dieren per geslacht op te nemen in de controlegroep en de groep met het hoogste dosisniveau, voor waarneming van reversibiliteit, persistentie of vertraagd tot uiting komen van systemische toxische effecten gedurende ten minste 14 dagen na de behandeling. De dieren in de satellietgroepen zullen niet paren en worden dan ook niet gebruikt voor de beoordeling van reproductie-/ontwikkelingstoxiciteit.

Dosering

28. In het algemeen zijn drie testgroepen en een controlegroep vereist. Als er geen bruikbare algemene toxiciteitsgegevens beschikbaar zijn, kan een bereikbepalingonderzoek worden uitgevoerd (bij dieren van dezelfde stam en dezelfde herkomst) om de orde van grootte van de te gebruiken doses te helpen bepalen. Afgezien van de toediening van de teststof worden de dieren in de controlegroep op identieke wijze behandeld als de dieren in de

testgroepen. Indien bij de toediening van de teststof van een vehiculum gebruik wordt gemaakt, moet dit aan de controlegroep in het hoogste gebruikte volume toegediend worden.

29. De dosisniveaus moeten worden gekozen in het licht van de bestaande gegevens over toxiciteit en (toxico)kinetica. Er moet ook rekening mee gehouden worden dat er verschillen kunnen zijn in gevoeligheid tussen drachtige en niet-drachtige dieren. Het hoogste dosisniveau moet zo worden gekozen dat toxische effecten optreden, maar geen sterfte of duidelijk lijden. Daarna moet een dalende reeks dosisniveaus gekozen worden om het verband tussen dosering en respons aan te tonen en bij het laagste niveau te komen tot een dosis zonder schadelijke effecten. Intervallen van een factor twee tot vier zijn vaak optimaal en het is vaak beter een vierde testgroep toe te voegen dan zeer grote intervallen (bv. meer dan een factor 10) tussen de doseringen te gebruiken.

30. Bij algemene toxiciteit (bv. verminderd lichaamsgewicht, effecten op lever, hart, longen of nieren enz.) of andere veranderingen die mogelijk geen toxische reacties zijn (bv. verminderde voedselinname, leververgroting), moeten de waargenomen effecten op hormoongevoelige eindpunten met de nodige omzichtigheid worden geïnterpreteerd.

Limiettest

31. Als volgens de hier beschreven procedures een onderzoek met orale toediening wordt uitgevoerd met één dosisniveau van ten minste 1000 mg/kg lichaamsgewicht/dag of, in het geval van toediening via het voer, het equivalente percentage in het voer, of het drinkwater (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 volledig onderzoek met meerdere dosisniveaus te doen. De limiettest is van toepassing tenzij blootstelling bij mensen een hogere dosering noodzakelijk maakt. Voor andere toedieningsvormen, zoals inhalatie of toediening op de huid, zal de maximaal haalbare blootstelling vaak worden bepaald door de fysisch-chemische eigenschappen van de teststoffen.

Toediening van de doses

32. De dieren krijgen de teststof 7 dagen per week dagelijks toegediend. 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 intubatiecanule. Het maximale volume dat in één keer kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het dier. Het volume mag niet groter zijn dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht, behalve wanneer het om een waterige oplossing gaat: in dat geval mag 2 ml/100 g lichaamsgewicht worden gebruikt. Afgezien van irriterende of bijtende teststoffen 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.

33. Het is belangrijk dat er bij teststoffen die via het voer of het drinkwater worden toegediend, voor wordt gezorgd dat de hoeveelheden teststof de normale voer- of waterbalans niet verstoren. Wanneer de teststof in het voer wordt toegediend, kan een constante concentratie in het voer (in ppm) of een constante dosis in verhouding tot het lichaamsgewicht van de dieren worden gebruikt; daarbij moet worden aangegeven welk alternatief is gebruikt. Wanneer de teststof met een sonde wordt toegediend, moeten de doses dagelijks op vaste tijdstippen worden gegeven. De doses moeten ten minste wekelijks worden aangepast om een constant dosisniveau als functie van het lichaamsgewicht van het dier te verkrijgen. Indien een gecombineerd onderzoek wordt gebruikt als voorstudie van een langdurig chronisch toxiciteitsonderzoek of een volledig reproductietoxiciteitsonderzoek, moet in beide onderzoeken dezelfde voeding worden gebruikt.

Proefopzet

34. Voor beide geslachten moet de toediening 2 weken voor het paren beginnen, nadat de dieren ten minste vijf dagen lang zijn geacclimatiseerd en de vrouwtjes gescreend zijn op normale oestruscycli (in een voorbehandelingsperiode van 2 weken). Het onderzoek moet zodanig worden ingepland dat de beoordeling van de oestruscyclus begint kort nadat de dieren volledig geslachtsrijp zijn. Dit kan enigszins variëren voor verschillende rattenstammen in verschillende laboratoria, bv. voor Sprague Dawley-ratten op een leeftijd van 10 weken, voor Wistar-ratten op een leeftijd van ongeveer 12 weken. Moederdieren met jongen moeten op dag 13 na het werpen worden gedood of kort daarna. Om de moederdieren voorafgaand aan de bloedafname een dag te laten vasten (als daaraan de voorkeur wordt gegeven) hoeven de vrouwtjes en hun jongen niet op dezelfde dag gedood te worden. De dag van de geboorte (d.w.z. wanneer het werpen is voltooid) wordt gedefinieerd als dag 0 na het werpen. Vrouwtjes die geen tekenen van copulatie vertonen, worden 24-26 dagen na de laatste dag van de paringsperiode gedood. Voor beide geslachten wordt de toediening gedurende de paringsperiode voortgezet. Daarna moeten de mannetjes de teststof ten minste nog toegediend krijgen tot de minimale totale doseringsperiode van 28 dagen is afgerond. Vervolgens worden ze gedood of, anders, in leven gehouden en verder behandeld voor een eventuele tweede paring.

35. De dagelijkse toediening aan de moederdieren moet doorgaan gedurende de dracht en ten minste tot en met dag 13 na het werpen of de dag voordat ze gedood worden. Voor onderzoeken waarbij de toediening van de teststof door middel van inhalatie of dermaal plaatsvindt, moet deze ten minste worden voortgezet tot en met dag 19 van de dracht en zo spoedig mogelijk en niet later dan postnatale dag (PND) 4 worden hervat.

36. Dieren in eventuele satellietgroepen die bestemd zijn voor vervolgwaarnemingen, paren niet. Ze moeten nog 14 dagen nadat de eerste moederdieren gedood worden, zonder behandeling geobserveerd worden om de persistentie van de toxische effecten c.q. het herstel alsmede het eventuele optreden van vertraagde toxiciteit te kunnen waarnemen.

37. In aanhangsel 2 wordt de proefopzet in een diagram weergegeven.

Oestruscycli

38. Voordat de behandeling begint, moeten de oestruscycli worden gecontroleerd om te selecteren op vrouwelijke proefdieren met regelmatige cycli (zie punt 27). Ook moeten er van het begin van de behandelingsperiode totdat paring is gebleken, dagelijks vaginale uitstrijkjes worden onderzocht. Indien vermoed wordt dat effecten van acute stress bij het begin van de behandeling de oestruscyclus zouden kunnen verstoren, kunnen de laboratoria de proefdieren gedurende 2 weken blootstellen en vervolgens ten minste 2 weken lang dagelijks vaginale uitstrijkjes nemen ter controle van de oestruscycli gedurende de periode vóór paring tot in de paringsperiode, totdat paring gebleken is. Wanneer monsters van vaginale/cervicale cellen worden genomen, moet erop worden gelet verstoring van het slijmvlies, die tot schijndracht kan leiden, te voorkomen (8) (9).

De paringsprocedure

39. Normaal gesproken moet men voor dit onderzoek één mannetje met één vrouwtje (1:1) laten paren. Hierop zijn uitzonderingen mogelijk in geval van incidentele sterfte van mannetjes. Het vrouwtje moet bij hetzelfde mannetje worden geplaatst totdat aanwijzingen voor copulatie zijn waargenomen of er twee weken zijn verstreken. Elke ochtend worden de vrouwtjes onderzocht op de aanwezigheid van sperma of vaginale plug. Dag 0 van de dracht wordt gedefinieerd als de dag waarop aanwijzingen voor paring worden bevestigd (observatie van een vaginale plug en/of sperma). Wanneer het paren geen succes heeft gehad, kan worden overwogen de vrouwtjes opnieuw te laten dekken door mannetjes van dezelfde groep waarvan de vruchtbaarheid is aangetoond.

Nestgrootte

40. Op PND 4 kan de grootte van de nesten worden aangepast door eliminatie van extra jongen door willekeurige selectie, zodat elk nest uiteindelijk zoveel mogelijk bestaat uit vier of vijf jongen per geslacht, afhankelijk van de normale nestgrootte van de gebruikte rattenstam. Bij twee van de overtollige jongen moeten bloedmonsters worden afgenomen, gepoold en gebruikt ter bepaling van de serumspiegels van T4. Selectieve eliminatie van jongen, bijvoorbeeld op grond van lichaamsgewicht of anogenitale afstand (AGD), is niet gepast. Als het door het aantal mannelijke of vrouwelijke jongen niet mogelijk is om op vier of vijf per geslacht per nest uit te komen, is gedeeltelijke aanpassing (bv. zes mannetjes en vier vrouwtjes) aanvaardbaar. Er worden geen jongen geëlimineerd als de nestgrootte daardoor onder de streefgrootte (8 of 10 jongen/nest) zou komen. Als er maar

één jong beschikbaar is boven de streefgrootte, wordt er slechts één jong geëlimineerd en gebruikt voor het nemen van een bloedmonster ter bepaling van serum-T4.

41. Als de nestgrootte niet wordt aangepast, worden er op PND 4 twee jongen per nest gedood en worden er bloedmonsters genomen voor het meten van de serumspiegels van schildklierhormonen. De twee jongen per nest moeten zo mogelijk vrouwelijke jongen zijn om de mannelijke jongen te bewaren voor de beoordeling van de tepelretentie, tenzij er na verwijdering van deze jongen geen enkel vrouwtje meer overblijft voor de beoordeling bij beëindiging van het onderzoek. Er worden geen jongen geëlimineerd als de nestgrootte daardoor onder de 8 of 10 jongen/nest (afhankelijk van de normale nestgrootte van de gebruikte rattenstam) zou komen. Als er maar één jong beschikbaar is boven de normale nestgrootte, wordt er slechts één jong geëlimineerd en gebruikt voor het nemen van een bloedmonster ter bepaling van serum-T4.

Waarnemingen

42. Algemene klinische waarnemingen moeten ten minste eenmaal per dag plaatsvinden, bij voorkeur steeds op hetzelfde tijdstip en met inachtneming 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.

43. Alle ouderdieren worden eenmaal vóór de eerste blootstelling 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 dezelfde dag uitgevoerd worden. De gegevens moeten zorgvuldig worden opgetekend, bij voorkeur met behulp van scoringssystemen die door het testlaboratorium expliciet zijn gedefinieerd. Er moet zo veel mogelijk worden gezorgd dat variaties in de testomstandigheden 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. Ook verandering in gang, houding en reactiviteit op vastpakken, alsmede de aanwezigheid van klonische of tonische bewegingen, stereotiep gedrag (bv. overmatige lichaamsverzorging, herhaaldelijk ronddraaien), een moeilijke of langdurige worp of bizar gedrag (bv. zelfverminking, achteruitlopen) moeten worden opgetekend (10).

44. In de loop van het onderzoek moet op enig moment bij vijf mannetjes en vijf vrouwtjes, die aselect worden gekozen uit elke groep, de sensorische reactiviteit op stimuli van verschillende aard (bv. auditief, visueel of proprioceptief) (8) (9) (11) worden bepaald en moet een bepaling van de grijpkracht (12) en de motorische activiteit (13) plaatsvinden. 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. Bij mannetjes moeten deze functionele waarnemingen tegen het einde van hun doseringsperiode worden gedaan, kort voordat ze gedood zullen worden, maar ook voordat er bloed wordt afgenomen voor hematologische en klinisch-chemische bepalingen (zie de punten 53-56, waaronder voetnoot 1). Vrouwtjes moeten tijdens deze functionele tests in een vergelijkbare fysiologische toestand verkeren en moeten bij voorkeur eenmaal worden getest in de laatste week van de zoogperiode (bv. zoogdag 6-13), kort voordat ze gedood worden. Probeer moederdieren en jongen steeds zo kort mogelijk van elkaar te scheiden.

45. Als het onderzoek wordt verricht als voorstudie voor een daaropvolgend subchronisch onderzoek van 90 dagen of langetermijnonderzoek, kunnen de eenmalige functionele waarnemingen tegen het einde van het onderzoek achterwege worden gelaten. In dat geval moeten de functionele waarnemingen in het bedoelde vervolgonderzoek plaatsvinden. Daar staat echter tegenover dat de beschikbaarheid van gegevens betreffende functionele waarnemingen uit het onderzoek met herhaalde toediening, de keuze van de dosisniveaus voor het daaropvolgende subchronische of langetermijnonderzoek ten goede kan komen.

46. Bij wijze van uitzondering 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.

47. De drachttijd moet worden geregistreerd en wordt berekend vanaf dag 0 van de dracht. Elke worp moet zo spoedig mogelijk na de geboorte te worden onderzocht, teneinde het aantal en geslacht van de jongen vast te stellen, alsmede het aantal doodgeborenen, levendgeborenen, ondermaatse jongen (jongen die aanmerkelijk kleiner zijn dan de corresponderende controlejongen) en de aanwezigheid van macroscopisch zichtbare afwijkingen.

48. Levende jongen moeten worden geteld en gesekst en de nesten moeten binnen 24 uur na de geboorte (dag 0 of 1 na het werpen) en ten minste op dag 4 en dag 13 na het werpen worden gewogen. Naast de in punt 43 en 44 beschreven waarnemingen voor ouderdieren moet elk afwijkend gedrag van de nakomelingen worden geregistreerd.

49. De AGD van elk jong moet worden gemeten op dezelfde postnatale dag tussen postnatale dag 0 en het einde van postnatale dag 4. Het lichaamsgewicht van elk jong moet worden bepaald op de dag dat de AGD wordt gemeten en de AGD moet genormaliseerd worden tot een maat voor jonggrootte, bij voorkeur de derdemachtswortel van het lichaamsgewicht (14). Het aantal tepels/tepelhoven bij mannelijke jongen moet worden geteld op postnatale dag 12 of 13, zoals aanbevolen in OESO-leidraad 151 (15).

Lichaamsgewicht en consumptie van voer en water

50. De mannetjes en vrouwtjes moeten worden gewogen op de eerste dag dat zij de teststof krijgen toegediend, vervolgens ten minste eenmaal per week en aan het einde van het onderzoek. De vrouwtjes moeten worden gewogen op de dagen 0, 7, 14 en 20 tijdens de dracht, binnen 24 uur na de geboorte (dag 0 of 1 na het werpen) en ten minste op dag 4 en dag 13 na het werpen. Deze waarnemingen worden voor elk volwassen dier apart gerapporteerd.

51. Vóór het paren, tijdens de dracht en tijdens het zogen, moet ten minste wekelijks de voerconsumptie worden gemeten. Tijdens de paringsperiode is deze meting facultatief. Wanneer de teststof via het drinkwater wordt toegediend, moet ook de waterconsumptie gedurende deze perioden worden gemeten.

Hematologie

52. Tijdens het onderzoek moeten eenmaal bij vijf mannetjes en vijf vrouwtjes, die aselect worden gekozen uit elke groep, de volgende hematologische onderzoeken worden verricht: hematocriet, hemoglobinegehalten, aantal rode bloedcellen, reticulocyten, totaal aantal en gedifferentieerde aantallen witte bloedcellen, aantal bloedplaatjes en bloedstollingstijd/vermogen. Indien de teststof of de vermeende metabolieten ervan oxiderende eigenschappen hebben, of hiervan een vermoeden bestaat, moeten andere bepalingen worden uitgevoerd, zoals van de methemoglobineconcentratie en de Heinz-lichaampjes.

53. Bij het nemen van de bloedmonsters moet worden genoteerd uit welk lichaamsdeel en hoe de monsters zijn genomen. Tijdens de bloedafname moeten de vrouwtjes in een vergelijkbare fysiologische toestand verkeren. Om praktische problemen in verband met de variabiliteit in het begin van de dracht te vermijden, kan de bloedafname bij vrouwtjes aan het einde van de periode voor het paren worden uitgevoerd als alternatief voor de monstername net voor of tijdens het euthanaseren van de dieren. De bloedmonsters van de mannetjes moeten bij voorkeur net voor of tijdens het euthanaseren van de dieren worden genomen. Als alternatieve mogelijkheid kan de bloedafname bij mannetjes ook aan het einde van de periode voor het paren worden uitgevoerd, wanneer dat tijdstip ook voor de vrouwtjes wordt gekozen.

54. De bloedmonsters moeten onder passende omstandigheden worden bewaard.

Klinische biochemie

55. Klinisch-biochemische bepalingen die bedoeld zijn om wezenlijke toxische effecten in weefsels en met name effecten op de nieren en lever te onderzoeken, moeten worden

verricht op bloedmonsters die zijn genomen bij de geselecteerde vijf mannetjes en vijf vrouwtjes uit elke groep. Het is aan te bevelen in de nacht voordat de bloedmonsters worden genomen de dieren voedsel te onthouden[1]. Onderzoek van plasma of 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 en sorbitoldehydrogenase), en galzuren. Bepaling van andere enzymen (van hepatische of andere oorsprong) en bilirubine kan onder bepaalde omstandigheden nuttige informatie geven.

56. Er worden bloedmonsters genomen van een gedefinieerde plaats op basis van het volgende schema:

- van ten minste twee jongen per nest op PND 4 als het aantal jongen dit toelaat (zie de punten 40-41);
- van alle moederdieren en ten minste twee jongen per nest op het tijdstip van doden op dag 13; en
- van alle volwassen mannetjes op het tijdstip van doden.

Alle bloedmonsters worden onder passende omstandigheden bewaard. In de bloedmonsters van de jongen op dag 13 en de volwassen mannetjes worden de serumspiegels van schildklierhormonen (T4) bepaald. Een verdere bepaling van T4 in bloedmonsters van moederdieren en jongen op dag 4 wordt verricht indien relevant. Eventueel kunnen ook andere hormonen worden gemeten indien relevant. Voor de schildklierhormoonanalyse kan bloed van jongen per nest gepoold worden. De schildklierhormonen (T4 en TSH) worden bij voorkeur als "totaal" gemeten.

57. Als optie kunnen tijdens de laatste week van het onderzoek de volgende urineonderzoeken worden verricht bij vijf aselect gekozen mannetjes uit elke groep, waarbij op regelmatige

[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 voornaamste reden is dat de toegenomen variabiliteit die onvermijdelijk het gevolg is van niet-vasten, subtiele effecten maskeert en de interpretatie bemoeilijkt. Aan de andere kant kan het 's nachts onthouden van voedsel echter interfereren met het algemene metabolisme van de (drachtige) dieren, verstoort het de melkproductie en het zooggedrag en kan het, met name in voedingsonderzoeken, de dagelijkse blootstelling aan de teststof verstoren. Als men de dieren een nacht laat vasten, moeten de klinisch-biochemische bepalingen voor de mannetjes verricht worden na de functionele waarnemingen in week 4 van het onderzoek. De moederdieren moeten nog een dag in leven worden gehouden nadat de jongen op bv. postnatale dag 13 worden weggenomen) De moederdieren moet vanaf zoogdag 13-14 's nachts voedsel worden onthouden en het bloed dat bij doding wordt afgenomen, moet voor de klinisch-chemische parameters worden gebruikt.

tijdstippen urinemonsters moeten worden genomen: uitzien, volume, osmolaliteit of relatieve dichtheid, pH, eiwit, glucose en bloed/bloedcellen.

58. Bovendien moet worden overwogen serummarkers van algemene weefselbeschadiging te onderzoeken. 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 en glucose bij nuchtere toestand, specifieke hormonen, methemoglobine en cholesterinase. Deze moeten per geval geïdentificeerd worden.

59. De volgende factoren kunnen van invloed zijn op de variabiliteit en de absolute concentraties van de hormoonbepalingen:

- tijdstip waarop de dieren worden gedood, vanwege de schommelingen in de hormoonconcentraties gedurende de dag;
- wijze waarop de dieren worden gedood: onnodige stress bij de dieren, waardoor de hormoonconcentraties kunnen worden beïnvloed, moet worden voorkomen;
- testkits voor hormoonbepalingen, die verschillende standaardkrommen kunnen hebben.

60. Plasmamonsters die specifiek voor hormoonbepaling zijn bedoeld, moeten telkens op hetzelfde moment van de dag worden genomen. De verschillende in de handel verkrijgbare "assay kits" kunnen verschillende numerieke waarden opleveren bij de analyse van hormoonconcentraties.

61. In het geval van ontoereikende basisgegevens uit het verleden moet worden overwogen de hematologische en klinisch-biochemische variabelen te bepalen, bij voorkeur bij een groep dieren die niet in de testgroepen zijn opgenomen, of anders voordat met de toediening wordt begonnen. Voor vrouwtjes moeten de gegevens verkregen zijn bij zogende dieren.

PATHOLOGIE

Macroscopische obductie

62. Bij alle volwassen dieren in het onderzoek moet een volledige macroscopische obductie worden uitgevoerd, waaronder een zorgvuldig onderzoek van het huidoppervlak, alle lichaamsopeningen alsmede de schedelholte, de borstholte en de buikholte, en de inhoud daarvan. Bijzondere aandacht moet worden geschonken aan de organen van het voortplantingssysteem. Het aantal implantatieplaatsen moet worden geregistreerd. Op de dag van obductie moeten er vaginale uitstrijkjes onderzocht worden om de fase van de oestruscyclus te bepalen en deze in verband te kunnen brengen met de histopathologie van de vrouwelijke geslachtsorganen.

63. De testes en epididymides, evenals de prostaat en de zaadblaasjes met coagulans afscheidende klieren als geheel van alle volwassen mannetjes moeten zo nodig worden

ontdaan van aanhechtend weefsel en zo spoedig mogelijk na de sectie nat worden gewogen om te voorkomen dat ze uitdrogen. Optionele organen die eventueel ook gewogen kunnen worden, zijn onder meer het m levator ani plus bulbocavernosuscomplex, de Cowperse klieren en de glans penis bij mannetjes en de gepaarde ovaria (nat gewicht) en uterus (inclusief cervix) bij vrouwtjes; indien deze gewichten worden meegenomen, moeten ze zo snel mogelijk na de sectie worden opgenomen. Van alle volwassen dieren moeten de ovaria, testes, epididymides, secundaire geslachtsorganen en alle organen die macroscopische letsels vertonen, worden geconserveerd.

64. Van alle volwassen mannetjes en vrouwtjes en één mannelijk en één vrouwelijk dag 13-jong uit elk nest moeten de schildklieren in een fixeermiddel worden bewaard dat geschikt is voor het beoogde latere histopathologische onderzoek. Het gewicht van de schildklier kan na de fixatie worden bepaald. Aanhechtend weefsel moet zeer voorzichtig en pas na fixatie worden verwijderd, om beschadiging van de weefsels te voorkomen. Weefselbeschadigingen kunnen de histopathologische analyse negatief beïnvloeden. De bloedmonsters moeten worden genomen net voor of tijdens het euthanaseren van de dieren; er moet worden genoteerd uit welk lichaamsdeel. De monsters moeten onder de juiste omstandigheden worden bewaard (zie punt 56).

65. Bovendien moeten van ten minste vijf volwassen mannetjes en vrouwtjes die aselect worden gekozen uit elke groep (afgezien van dieren die stervend zijn aangetroffen en/of zijn gedood vóór beëindiging van het onderzoek) de lever, nieren, bijnieren, thymus, milt, hersenen en het hart zo nodig worden ontdaan van aanhechtend weefsel en zo spoedig mogelijk na de sectie nat worden gewogen om te voorkomen dat ze uitdrogen. De volgende weefsels moeten in een fixeermiddel worden bewaard dat zowel voor het type weefsel als voor het beoogde latere histopathologische onderzoek geschikt is: elk macroscopisch waarneembaar letsel, hersenen (representatieve delen waaronder cerebrum, cerebellum en pons), ruggenmerg, oog, maag, dunne en dikke darm (inclusief Peyerse platen), lever, nieren, bijnieren, milt, hart, thymus, luchtpijp en longen (conserveren door opblazen met een fixatief en dan onderdompelen), geslachtsklieren (testes en ovaria), secundaire geslachtsorganen (uterus en cervix, epididymides, prostaat, zaadblaasjes plus coagulans uitscheidende klieren), vagina, urineblaas, lymfeklieren (naast de meest proximale afvoerende lymfeklier moet ook een andere lymfeklier worden uitgenomen, afhankelijk van de ervaringen van het laboratorium (16)), perifere zenuwen (nervus ischiadicus of nervus tibialis), bij voorkeur dicht bij de spier, skeletspier en bot, met beenmerg (een coupe, of in plaats daarvan een direct op een objectglaasje aangebracht stukje beenmergaspiraat). Aanbevolen wordt de testes te fixeren door middel van onderdompeling in Bouin-oplossing of gemodificeerde Davidson-oplossing (16) (17) (18); fixatie in formaline wordt voor deze weefsels niet aanbevolen. De tunica albuginea kan voorzichtig en ondiep met een naald worden ingeprikt op de beide polen van het orgaan, zodat het fixatief snel kan binnendringen. 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 kunnen worden aangetast, moeten worden bewaard.

66. De volgende weefsels kunnen nuttige aanwijzingen geven voor met het endocrien systeem samenhangende effecten: geslachtsklieren (ovaria en testes), secundaire geslachtsorganen (uterus inclusief cervix, epididymides, zaadblaasjes met coagulans afscheidende klieren, dorsolaterale en ventrale prostaat), vagina, hypofyse, mannelijke borstklier en bijnier. Er bestaat onvoldoende documentatie over veranderingen in de mannelijke borstklieren, maar deze parameter zou kan erg gevoelig kunnen zijn voor stoffen met oestrogene werking. De waarneming van niet in de lijst van punt 65 opgenomen organen/weefsels is facultatief.

67. Dode jongen en jongen die op dag 13 na het werpen, of kort daarna, zijn gedood, moeten in elk geval uitwendig zorgvuldig worden onderzocht op macroscopisch zichtbare afwijkingen. Daarbij wordt met name gelet op de uitwendige voortplantingsorganen, die op tekenen van een afwijkende ontwikkeling worden onderzocht.

Histopathologie

68. 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 (met speciale aandacht voor de stadia van de spermatogenese en de histopathologie van de interstitiële testiculaire celstructuur). Van jongen en van de overgebleven volwassen dieren kan de schildklier worden onderzocht indien nodig. Wanneer er behandelingsgerelateerde veranderingen worden waargenomen in de hogedosisgroep, moeten ook de dieren in de andere doseringsgroepen worden onderzocht. In de richtsnoeren voor histopathologisch onderzoek (10) zijn nadere gegevens opgenomen over de sectie, de fixatie, het snijden van coupes en de histopathologie van endocriene weefsels.

69. Alle macroscopisch waarneembare beschadigingen moeten onderzocht worden. Om bij te dragen tot de bepaling van de NOAEL moeten de doelorganen in andere dosisgroepen worden onderzocht, vooral in groepen waarvoor een NOAEL wordt geclaimd.

70. 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.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

71. Er worden voor elk dier apart gegevens verstrekt. Daarnaast moeten alle gegevens worden samengevat in tabelvorm, waarbij voor elke testgroep worden vermeld: het aantal dieren

aan het begin van de test, het aantal dieren dat tijdens de test dood is aangetroffen of met het oog op een humane behandeling is gedood, het tijdstip van sterfte of doding, het aantal vruchtbare dieren, het aantal drachtige vrouwtjes, het aantal dieren met toxiciteitsverschijnselen, een beschrijving van de waargenomen toxiciteitsverschijnselen met vermelding van de aanvang, de duur en de ernst van de toxische effecten, de aard van de histopathologische veranderingen en alle relevante gegevens over de nesten. In aanhangsel 3 is een opzet van een overzichtstabel opgenomen die heel praktisch is gebleken voor de beoordeling van effecten op de voortplanting en de ontwikkeling.

72. Waar mogelijk moeten getalsmatige resultaten met behulp van een geschikte en algemeen erkende statistische methode worden geëvalueerd. Het gebruik van meerdere t-tests moet worden voorkomen door vergelijking van het effect over een dosisbereik. De statistische methoden moeten gedurende de opzet van het onderzoek worden gekozen. De statistische analyse van de AGD en de tepelretentie moet worden gebaseerd op de gegevens voor afzonderlijke jongen, waarbij rekening wordt gehouden met nesteffecten. Waar passend is het nest de analyse-eenheid. De statistische analyse van lichaamsgewicht van de jongen moet worden gebaseerd op de gegevens voor afzonderlijke jongen, waarbij rekening wordt gehouden met nestgrootte. Vanwege de beperkte omvang van het onderzoek, zijn statistische analyses in de vorm van toetsen voor "significantie" voor veel eindpunten, vooral die in verband met de voortplanting, van beperkte waarde. Sommige van de meest gebruikte methoden, met name parametrische toetsen voor het meten van de centrale tendens, zijn niet geschikt. Als er statistische analyses worden gebruikt, moeten de gekozen methoden geschikt zijn voor de verdeling van de onderzochte variabele en moeten ze vóór de start van het onderzoek worden gekozen.

Evaluatie van de resultaten

73. De resultaten van dit toxiciteitsonderzoek worden beoordeeld aan de hand van de waargenomen effecten en de resultaten van de obductie en het microscopisch onderzoek. De beoordeling omvat het verband tussen de dosis van de teststof en de aanwezigheid of afwezigheid, de frequentie en de ernst van afwijkingen zoals macroscopisch letsel, gespecificeerde doelorganen, onvruchtbaarheid, klinische afwijkingen, aantasting van de reproductie- en nestresultaten, veranderingen in het lichaamsgewicht, effecten op de mortaliteit en andere toxische effecten.

74. Vanwege de korte behandelperiode van de mannetjes, moeten bij de beoordeling van effecten op de voortplanting bij mannetjes niet alleen de vruchtbaarheidsgegevens, maar ook de histopathologie van de testes en de epididymides in aanmerking worden genomen. Ook het gebruik van historische controlegegevens over voortplanting/ontwikkeling (bv. voor nestgrootte, AGD, tepelretentie, T4-serumspiegels), indien beschikbaar, kan nuttig zijn ter ondersteuning van de interpretatie van het onderzoek.

75. Voor de kwaliteitscontrole wordt voorgesteld historische controlegegevens te verzamelen en variatiecoëfficiënten te berekenen voor numerieke gegevens, met name voor de parameters die verband houden met het opsporen van hormoonontregelaars. Deze gegevens kunnen voor vergelijkingsdoeleinden worden gebruikt wanneer daadwerkelijk uitgevoerd onderzoek wordt geëvalueerd.

Testverslag

76. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

- bron, partijnummer, uiterste gebruiksdatum, indien beschikbaar;
- stabiliteit van de teststof, indien bekend.

Stof die uit één component bestaat:

- fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water en aanvullende relevante fysisch-chemische eigenschappen;
- chemische identificatiegegevens, zoals IUPAC- of CAS-naam, CAS-nummer, SMILES- of InChI-code, structuurformule, zuiverheid, chemische identiteit van onzuiverheden, indien van toepassing en praktisch haalbaar enz.

Stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB's en mengsels:

- voor zover mogelijk, karakterisering aan de hand van chemische identiteit (zie hierboven), kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen van de bestanddelen.

Vehiculum (indien van toepassing):

- motivering voor de keuze van het vehiculum, indien geen water wordt gebruikt.

Proefdieren:

- gebruikte soort/stam;
- aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;
- herkomst, leefomstandigheden, voeding enz.;
- gewicht van elk dier aan het begin van de test;
- motivering voor het gebruik van een ander soort dan ratten.

Testomstandigheden:

- achtergrond voor de keuze van de dosisniveaus;

- gedetailleerde gegevens over de formulering van de teststof, de bereiding van het voer en de bereikte concentratie, stabiliteit en homogeniteit van het preparaat;
- gedetailleerde gegevens over de toediening van de teststof;
- omrekening van de concentratie van de teststof in het voer/drinkwater (in ppm) naar de feitelijke dosis (in mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing;
- gedetailleerde gegevens over de kwaliteit van het voer en het water;
- gedetailleerde beschrijving van de randomisatieprocedure voor de selectie van te ruimen jongen, indien van toepassing.

Resultaten:

- lichaamsgewicht en veranderingen in het lichaamsgewicht;
- waar van toepassing, voedselverbruik en waterverbruik;
- gegevens over de toxische reactie naar geslacht en dosis, met inbegrip van vruchtbaarheid, dracht en andere gegevens over
- toxiciteit;
- duur van de dracht;
- toxische of andere effecten op de reproductie, de jongen, de postnatale groei enz.;
- aard, ernst en duur van (al dan niet reversibele) klinische waarnemingen;
- bepalingen van de sensorische activiteit, grijpkracht en motorische activiteit;
- uitgevoerde hematologische onderzoeken en de relevante referentiewaarden;
- uitgevoerde klinisch-biochemische onderzoeken en de relevante referentiewaarden;
- aantal volwassen vrouwtjes met een normale of abnormale oestruscyclus en cyclusduur van deze vrouwtjes;
- aantal levend geboren jongen en verliezen na implantatie;
- aantal jongen met macroscopisch zichtbare afwijkingen; macroscopische beoordeling van de uitwendige geslachtsorganen, aantal ondermaatse jongen;
- tijdstip van sterfte tijdens het onderzoek en of de dieren overleefden tot het einde van het onderzoek;
- aantal implantaties, nestgrootte en nestgewichten op het moment van registratie;
- gegevens over het lichaamsgewicht van jongen;
- AGD van alle jongen (en lichaamsgewicht op de dag van de AGD-meting);
- tepelretentie bij mannelijke jongen;

- schildklierhormoonspiegels bij dag 13-jongen en volwassen mannetjes (en moederdieren en dag 4-jongen indien gemeten);
- lichaamsgewicht bij het doden van de dieren en gegevens over het gewicht van organen voor de ouderdieren;
- obductiebevindingen;
- een gedetailleerde beschrijving van histopathologische bevindingen;
- resorptiegegevens (indien beschikbaar);
- een statistische behandeling van de resultaten, indien van toepassing.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

Interpretatie van resultaten

77. Op basis van dit onderzoek kan de reproductie-/ontwikkelingstoxiciteit worden beoordeeld bij de toediening van herhaalde doses. Aangezien de nadruk wordt gelegd op zowel het eindpunt algemene toxiciteit als het eindpunt reproductie-/ontwikkelingstoxiciteit, kan met de resultaten van het onderzoek in het bijzonder onderscheid worden gemaakt tussen reproductie-/ontwikkelingseffecten die zich voordoen bij afwezigheid van algemene toxiciteit, en reproductie-/ontwikkelingseffecten die alleen tot uitdrukking komen bij niveaus die ook toxisch zijn voor ouderdieren (zie de punten 7-11). Het onderzoek zou een indicatie kunnen geven of verder onderzoek nodig is en zou oriëntatiepunten kunnen bieden voor de opzet van vervolgonderzoeken. OESO-leidraad nr. 43 moet worden geraadpleegd voor hulp bij de interpretatie van resultaten op het gebied van reproductie- en voortplantingstoxiciteit (19). In OESO-leidraad nr. 106 over de histologische beoordeling van endocriene en voortplantingstests bij knaagdieren (16) is informatie te vinden over het prepareren en beoordelen van (endocriene) organen en vaginale uitstrijkjes, die van nut kan zijn voor deze testmethode.

LITERATUUR

(1) OESO (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Op aanvraag verkrijgbaar bij de Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(2) OESO (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. . Op aanvraag verkrijgbaar bij de Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. and Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). J. *Toxicol*, Sci., 19, 141-149.

(4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. and Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. Fundam. Appl. *Toxicol*., 18, 89-95.

(5) OESO (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Op aanvraag verkrijgbaar bij de Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(6) OESO (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(7) OESO (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M.and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.

(9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (Eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (No 60).

(11) Moser V.C., McDaniel K.M. and Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol*. Appl. *Pharmacol*., 108, 267-283.

(12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. and Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. *Toxicol*., 1, 233-236.

(13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599-609.

(14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds. (1999). "Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights", Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(15) OESO (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(16) OESO (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 106), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(17) Hess RA and Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(18) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol*. *Pathol*. 30, 524-533.

(19) OESO (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications,

Series on Testing and Assessment (No 43), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(20) OESO (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

Aanhangsel 1

DEFINITIES (ZIE OOK (20) OESO-LEIDRAAD 150)

Androgene werking: het vermogen van een chemische stof om in een zoogdierorganisme als een natuurlijk androgeen hormoon (bv. testosteron) te werken.

Antiandrogene werking: het vermogen van een chemische stof om in een zoogdierorganisme de werking van een natuurlijk androgeen hormoon (bv. testosteron) te onderdrukken.

Antioestrogene werking: het vermogen van een chemische stof om in een zoogdierorganisme de werking van een natuurlijk oestrogeen hormoon (bv. 17β-oestradiol) te onderdrukken.

Antithyreoïde werking: het vermogen van een chemische stof om in een zoogdierorganisme de werking van een natuurlijk schildklierhormoon (bv. T_3) te onderdrukken.

Chemische stof: een stof of mengsel.

Dosering: een algemene term die de dosis, de frequentie en de duur van de toediening omvat.

Dosis: de toegediende hoeveelheid teststof. De dosis wordt uitgedrukt als gewicht van de teststof per eenheid lichaamsgewicht van het proefdier per dag (bv. mg/kg lichaamsgewicht/dag), of als constante voedingsconcentratie.

Manifeste toxiciteit: een algemene term die duidelijke toxiciteitsverschijnselen beschrijft die optreden na de toediening van de teststof. Deze verschijnselen moeten een beoordeling van de gevaren 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.

Maternale toxiciteit: schadelijke effecten bij drachtige vrouwtjes, die hetzij specifiek optreden (direct effect), hetzij niet-specifiek (indirect effect), en die verband houden met de dracht.

NOAEL: afkorting van "no-observed-adverse-effect level", het niveau waarbij geen schadelijk effect werd vastgesteld. Dit is het hoogste dosisniveau waarbij nog geen aan de behandeling gebonden nadelige effecten worden vastgesteld.

Oestrogene werking: het vermogen van een chemische stof om in een zoogdierorganisme als een natuurlijk oestrogeen hormoon (bv. 17β-oestradiol) te werken.

Ontwikkelingstoxiciteit: de wijze waarop reproductietoxiciteit zich manifesteert, in de vorm van pre-, peri- en postnatale, structurele of functionele afwijkingen bij nakomelingen.

Reproductietoxiciteit: schadelijke effecten op de nakomelingen en/of verstoring van de

voortplantingsfuncties of het voortplantingsvermogen bij mannetjes en vrouwtjes.

Teststof: elke volgens deze testmethode getest(e) stof of mengsel.

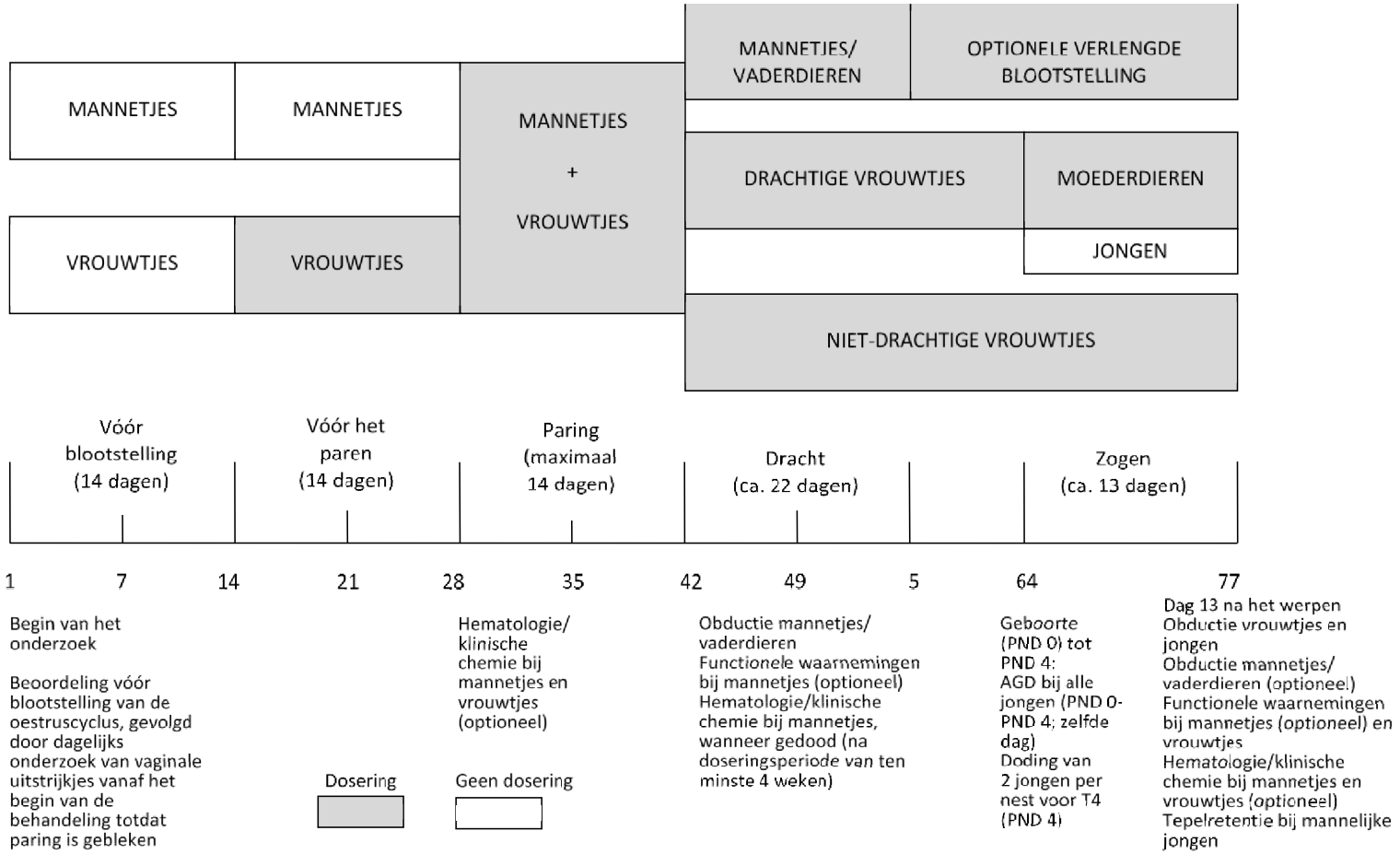
Thyreoïde werking: het vermogen van een chemische stof om in een zoogdierorganisme als een natuurlijk schildklierhormoon (bv. T_3) te werken.

Validering: een wetenschappelijke methode die erop gericht is om de operationele vereisten en beperkingen van een testmethode te beschrijven en de betrouwbaarheid en relevantie ervan voor een bepaald doel aan te tonen.

Verstoring van de vruchtbaarheid: afwijkingen in de voortplantingsfuncties of het voortplantingsvermogen bij mannetjes of vrouwtjes.

Aanhangsel 2

DIAGRAM VAN DE PROEFOPZET MET DE MAXIMALE ONDERZOEKSDUUR OP BASIS VAN EEN VOLLEDIGE 14-DAAGSE PARINGSPERIODE



Aanhangsel 3

OVERZICHTSTABEL VAN DE EFFECTEN OP REPRODUCTIE/ONTWIKKELING

WAARNEMINGEN	WAARDEN				
Dosering (eenheden)…….	**0 (controle)**	**. . .**	**. . .**	**. . .**	**. . .**
Paren bij begin (N)					
Oestruscyclus (ten minste gemiddelde duur en frequentie van onregelmatige cycli)					
Vrouwtjes met aanwijzingen voor copulatie (N)					
Vrouwtjes die drachtig worden (N)					
Dagen conceptie 1 - 5 (N)					
Dagen conceptie 6 - . . .[1] (N)					
Dracht ≤ 21 dagen (N)					
Dracht = 22 dagen (N)					
Dracht ≥ 23 dagen (N)					
Moederdieren met levend geboren jongen (N)					
Moederdieren met levende jongen op postnatale dag 4 (N)					
Implantaten/moederdier (gemiddeld)					
Levende jongen/moederdier bij geboorte (gemiddeld)					
Levende jongen/moederdier op dag 4 (gemiddeld)					
Geslachtsverhouding (m/v) bij geboorte (gemiddeld)					
Geslachtsverhouding (m/v) op dag 4 (gemiddeld)					
Gewicht van het nest bij geboorte (gemiddeld)					
Gewicht van het nest op dag 4 (gemiddeld)					
Gewicht van de jongen bij geboorte (gemiddeld)					
Gewicht van de jongen op het moment van AGD-meting (gemiddeld bij mannetjes, gemiddeld bij vrouwtjes)					
AGD jongen op dezelfde postnatale dag, geboorte - dag 4 (gemiddeld bij mannetjes, gemiddeld bij vrouwtjes)					
Gewicht van de jongen op dag 4 (gemiddeld)					
Gewicht van de jongen op dag 13 (gemiddeld)					
Tepelretentie bij mannelijke jongen op dag 13 (gemiddeld)					
AFWIJKENDE JONGEN					

[1] laatste dag paringsperiode

Moederdieren met 0					
Moederdieren met 1					
Moederdieren met ≥ 2					
VERLIES VAN NAKOMELINGEN					
Vóór geboorte (implantaties minus levend geborenen)					
Vrouwtjes met 0					
Vrouwtjes met 1					
Vrouwtjes met 2					
Vrouwtjes met ≥ 3					
Na geboorte (levend geboren en minus levende jongen op PND 13)					
Vrouwtjes met 0					
Vrouwtjes met 1					
Vrouwtjes met 2					
Vrouwtjes met ≥ 3					

B.65. IN-VITROHUIDCORROSIE: TESTMETHODE OP BASIS VAN DE MEMBRAANBARRIÈRE

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 435 (2015) van de OESO. Onder huidcorrosie wordt verstaan: het ontstaan van irreversibele schade aan de huid in de vorm van zichtbare necrose door de epidermis heen in de dermis, na het aanbrengen van een teststof (zoals gedefinieerd door het mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, GHS) van de Verenigde Naties (VN) (1) en Verordening (EU) nr. 1272/2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels (CLP-verordening)[1]). Deze testmethode, die gelijkwaardig is aan de bijgewerkte testrichtlijn 435 van de OESO, bevat een in-vitrotestmethode op basis van de membraanbarrière die kan worden gebruikt om corrosieve chemische stoffen te identificeren. De testmethode maakt gebruik van een kunstmatige membraan die is ontwikkeld om op een vergelijkbare manier op corrosieve chemische stoffen te reageren als dierenhuid in situ.

2. De traditionele manier om huidcorrosiviteit te beoordelen is door de teststof op de huid van levende dieren aan te brengen en na een bepaalde tijdsperiode de mate van weefselschade te beoordelen (2). Behalve deze testmethode is er een aantal andere in-vitrotestmethoden vastgesteld als alternatief (3) (4) voor de standaard in-vivoprocedure met konijnenhuid (hoofdstuk B.4 van deze bijlage, gelijkwaardig aan TG 404 van de OESO) die wordt gebruik om corrosieve chemische stoffen te identificeren (2). In de gefaseerde test- en evaluatiestrategie van het VN-GHS voor de beoordeling en classificatie van huidcorrosiviteit en de OESO-leidraad voor een geïntegreerde test- en beoordelingsbenadering (Integrated Approach on Testing and Assessment, IATA) voor huidcorrosie en -irritatie wordt aanbevolen om de gevalideerde en erkende in-vitrotestmethoden uit de modules 3 en 4 te gebruiken (1) (5). De IATA omvat verschillende modules met gedeelde informatiebronnen en analyse-instrumenten en i) biedt richtsnoeren voor de integratie en het gebruik van bestaande gegevens die zijn verzameld met behulp van test- en niet-testmethoden om het potentieel voor huidirritatie en -corrosie

[1] Verordening (EG) nr. 1272/2008 van het Europees Parlement en de Raad van 16 december 2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels, tot wijziging en intrekking van de Richtlijnen 67/548/EEG en 1999/45/EG en tot wijziging van Verordening (EG) nr. 1907/2006, PB L 353 van 31.12.2008, blz. 1.

van chemische stoffen te beoordelen en ii) draagt een benadering aan voor wanneer verder testen nodig is, onder meer wanneer er negatieve resultaten worden gevonden (5). Volgens deze modulaire aanpak kan een chemische stof op grond van positieve resultaten van in-vitrotestmethoden als corrosief worden ingedeeld, zonder dat er dierproeven nodig zijn, waardoor het gebruik van dieren voor dergelijke proeven wordt verminderd en verfijnd, en pijn en leed waarmee het gebruik van dieren voor dit doel gepaard zou kunnen gaan, worden vermeden.

3. Er zijn valideringsstudies afgerond voor het in-vitromembraanbarrièremodel dat in de handel verkrijgbaar is als Corrositex® (6) (7) (8). Daarin scoorde het een algemene nauwkeurigheid in het voorspellen van huidcorrosiviteit van 79 % (128/163), een gevoeligheid van 85 % (76/89), en een specificiteit van 70 % (52/74) voor een databank van 163 stoffen en mengsels (7). Op basis van deze erkende validiteit wordt deze gevalideerde referentiemethode (VRM) aanbevolen voor gebruik als onderdeel van een gefaseerde teststrategie voor de beoordeling van het mogelijke huidcorrosiegevaar van chemische stoffen (5) (7). Voordat een in-vitromembraanbarrièremodel voor huidcorrosie kan worden gebruikt met het oog op regelgeving, moeten de betrouwbaarheid, relevantie (nauwkeurigheid) en beperkingen ervan voor het voorgestelde gebruik bepaald worden om te waarborgen dat deze vergelijkbaar zijn met die van de VRM (9), overeenkomstig de vooraf vastgestelde prestatienormen (10). De wederzijdse aanvaarding van gegevens in overeenstemming met de OESO-overeenkomst is pas gewaarborgd wanneer een voorgestelde nieuwe of bijgewerkte methode volgens de prestatienormen is geëvalueerd en zijn opgenomen in de gelijkwaardige OESO-testrichtlijn. Op dit moment bestrijken OESO-testrichtlijn 435 en deze testmethode slechts een enkele in-vitromethode: het model Corrositex®, dat in de handel verkrijgbaar is.

4. Andere testmethoden voor het testen op huidcorrosiviteit zijn gebaseerd op het gebruik van gereconstrueerde menselijke huid (OESO-TG 431) (3) en geïsoleerde rattenhuid (OESO TG 430) (4). Deze testrichtlijn voorziet ook in de nadere indeling van corrosieve chemische stoffen in de drie VN-GHS-subcategorieën voor corrosiviteit en de drie VN-verpakkingsgroepen voor vervoer betreffende gevaar van corrosiviteit. Deze testrichtlijn werd oorspronkelijk vastgesteld in 2006 en bijgewerkt in 2015 met verwijzingen naar de IATA-leidraad en met een bijgewerkte lijst van stoffen voor bekwaamheidstoetsing.

DEFINITIES

5. Gebruikte definities worden gegeven in het aanhangsel.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

6. Met de test die in deze testmethode wordt beschreven, kunnen corrosieve teststoffen worden geïdentificeerd en ingedeeld in subcategorieën volgens VN-GHS/CLP (tabel 1).

Bovendien kan een dergelijke testmethode worden gebruikt voor het nemen van beslissingen over de corrosieve en niet-corrosieve aard van specifieke klassen van chemische stoffen, bv. organische en anorganische zuren, afgeleide zuren[1] en basen ten behoeve van bepaalde vervoerstests (7) (11) (12). In deze testmethode wordt een algemene procedure beschreven die vergelijkbaar is met de gevalideerde referentietestmethode (7). Hoewel deze testmethode geen toereikende informatie over huidirritatie oplevert, moet worden opgemerkt dat TM B.46 (gelijkwaardig aan OESO-TG 439) specifiek betrekking heeft op het gezondheidseffect huidirritatie in vitro (13). Voor een volledige beoordeling van lokale huideffecten na één blootstelling op de huid moet de OESO-leidraad voor een geïntegreerde test- en beoordelingsbenadering (Integrated Approach on Testing and Assessment, IATA) worden geraadpleegd (5).

Tabel 1: De VN-GHS-categorie en -subcategorieën voor huidcorrosie (1)

Categorie voor corrosiviteit (categorie 1) (voor autoriteiten die geen subcategorieën gebruiken)	**Eventuele subcategorieën voor corrosiviteit[2] (voor autoriteiten die subcategorieën gebruiken, waaronder de CLP-verordening)**	**Corrosief bij ≥ 1 van de 3 dieren**	
		Blootstellingstijd	**Waarneming**
Corrosief	Subcategorie voor corrosiviteit 1A	≤ 3 minuten	≤1 uur
	Subcategorie voor corrosiviteit 1B	> 3 minuten / ≤ 1 uur	≤ 14 dagen
	Subcategorie voor corrosiviteit 1C	> 1 uur / ≤ 4 uur	≤ 14 dagen

7. De gevalideerde referentiemethode (7) heeft als beperking dat de test op basis van de resultaten van de voorafgaande compatibiliteitstest (zie punt 13) voor veel niet-corrosieve chemische stoffen en sommige corrosieve chemische stoffen mogelijk niet geschikt is. Voor veel waterige chemische stoffen met een pH in het gebied tussen 4,5 en 8,5 is de test niet geschikt; er zij evenwel opgemerkt dat 85 % van de geteste chemische stoffen in dit pH-bereik in dierproeven niet-corrosief bleken (7). De in-vitromembraanbarrièremethode

[1] "Afgeleid zuur" is een niet-specifieke klasse-aanduiding en wordt ruwweg gedefinieerd als een zuur dat wordt geproduceerd op basis van een chemische stof, hetzij rechtstreeks, hetzij door modificatie of gedeeltelijke substitutie. Deze klasse omvat anhydriden, halozuren, zouten en andere typen chemische stoffen.

[2] Voor de EU worden in de CLP-verordening de drie subcategorieën voor huidcorrosie 1A, 1B en 1C toegepast.

kan worden gebruikt voor het testen van vaste stoffen (al dan niet oplosbaar in water), vloeistoffen (waterig of niet-waterig) en emulsies. Teststoffen die in de compatibiliteitstest geen merkbare verandering teweegbrachten (d.w.z. kleurverandering in het chemische detectiesysteem (CDS) van de gevalideerde testmethode), kunnen niet met de membraanbarrièremethode worden getest en moeten worden getest met andere testmethoden.

PRINCIPE VAN DE TEST

8. Het testsysteem bestaat uit twee componenten: een synthetische macromoleculaire biobarrière en een chemisch detectiesysteem (CDS); via het CDS detecteert deze testmethode schade aan de membraanbarrière veroorzaakt door corrosieve teststoffen, nadat de teststof op het oppervlak van de synthetische macromoleculaire membraanbarrière is aangebracht (7), schade die waarschijnlijk wordt toegebracht volgens hetzelfde/dezelfde corrosiemechanisme(n) als bij levende huid.

9. Er zijn meerdere procedures of CDS'en om de doordringing (of doorbraak) van de membraanbarrière te meten, zoals een verandering in de kleur van een pH-indicator of in een andere eigenschap van de indicatoroplossing onder de barrière.

10. Er moet worden vastgesteld dat de membraanbarrière geschikt is, d.w.z. relevant en betrouwbaar, voor het beoogde doel. Daartoe moet men nagaan dat verschillende preparaten consistent zijn wat betreft hun barrière-eigenschappen, bv. dat ze een barrière in stand kunnen houden tegen niet-corrosieve chemische stoffen en dat de corrosieve eigenschappen van chemische stoffen ermee kunnen worden ingedeeld in de verschillende VN-GHS-subcategorieën voor corrosiviteit (1). De toegekende indeling is gebaseerd op de tijd die een chemische stof erover doet om door de membraanbarrière door te dringen tot de indicatoroplossing.

AANTONING VAN BEKWAAMHEID

11. Voordat de in-vitromembraanbarrièremethode routinematig wordt gebruikt op een manier die aan deze testmethode voldoet, moeten laboratoria hun technische bekwaamheid aantonen door een correcte indeling van de twaalf in tabel 2 aanbevolen stoffen voor bekwaamheidstoetsing. Wanneer een stof uit de lijst niet beschikbaar is of indien zulks gerechtvaardigd is, kan een andere stof waarvoor voldoende in-vivo- en in-vitroreferentiegegevens beschikbaar zijn, worden gebruikt (bv. uit de lijst met referentiestoffen (10)), mits dezelfde selectiecriteria als in tabel 1 worden toegepast.

Tabel 2: Stoffen voor bekwaamheidstoetsing[1]

Stof[2]	**CAS RN**	**Chemische klasse**	**In-vivo-VN-GHS-**	**In-vitro-VN-GHS-**

			subcategorie[3]	**subcategorie[3]**
Boortrifluoridedihydraat	13319-75-0	Anorganische zuren	1A	1A
Salpeterzuur	7697-37-2	Anorganische zuren	1A	1A
Fosforpentachloride	10026-13-8	Precursoren van anorganische zuren	1A	1A
Valerylchloride	638-29-9	Zuurchloriden	1B	1B
Natriumhydroxide	1310-73-2	Anorganische basen	1B	1B
1-(2-Aminoethyl)piperazine	140-31-8	Alifatische aminen	1B	1B
Benzeensulfonylchloride	98-09-9	Zuurchloriden	1C	1C
N,*N*-Dimethylbenzylamine	103-83-3	Anilinen	1C	1C
Tetraëthyleenpentamine	112-57-2	Alifatische aminen	1C	1C
Eugenol	97-53-0	Fenolen	NC	NC
Nonylacrylaat	2664-55-3	Acrylaten/methacrylaten	NC	NC
Natriumbicarbonaat	144-55-8	Anorganische zouten	NC	NC

[1]De bovenstaande lijst van twaalf stoffen bevat drie stoffen voor elk van de drie VN-GHS subcategorieën voor corrosieve stoffen en drie niet-corrosieve stoffen. Deze stoffen zijn gemakkelijk verkrijgbaar bij commerciële leveranciers en de VN-GHS subcategorie is gebaseerd op de resultaten van hoogwaardige in-vivotests. Deze stoffen zijn ontleend aan een lijst van 40 referentiestoffen die zijn opgenomen in de minimumlijst van chemische stoffen die zijn aangewezen voor het aantonen van de nauwkeurigheid en betrouwbaarheid van testmethoden die structureel en functioneel vergelijkbaar zijn met de gevalideerde testmethode en werden geselecteerd uit de 163 referentiestoffen die oorspronkelijk werden gebruikt voor de validering van de referentietestmethode (Corrositex®) (7) (10) (14). Met dit selectieproces werd beoogd om voor zover mogelijk chemische stoffen op te nemen die: het hele spectrum aan corrosieve responsen bestreken (bv. niet-corrosieve stoffen; corrosieve stoffen uit VN-verpakkingsgroepen I, II en III) dat met de gevalideerde referentietestmethode gemeten of voorspeld kan worden; representatief waren voor de chemische klassen die in het valideringsproces zijn gebruikt; een goed omschreven chemische structuur hebben; reproduceerbare resultaten opleverden in de gevalideerde referentietestmethode; eenduidige resultaten opleverden in de in-vivoreferentietest; in de handel verkrijgbaar waren; en waaraan geen buitensporige verwijderingskosten verbonden waren (14).

[2]Stoffen onverdund getest of met zuiverheid ≥ 90 %.
[3]De overeenkomstige VN-verpakkingsgroepen voor de VN-GHS-subcategorieën 1A, 1B en 1C zijn respectievelijk I, II en III. NC: niet-corrosief.

PROCEDURE

12. In de volgende punten worden de componenten en procedures beschreven van een testmethode op basis van een kunstmatige membraanbarrière voor het beoordelen van corrosiviteit (7) (15) op basis van de huidige VRM, d.w.z. de in de handel verkrijgbare Corrositex®. De membraanbarrière en de compatibiliteits-/indicator- en

categoriseringsoplossingen kunnen worden opgebouwd, bereid of in de handel worden verkregen zoals in het geval van de VRM Corrositex®. Er is voor de gevalideerde referentietestmethode een voorbeeld van een testmethodeprotocol beschikbaar (7). De test moet worden uitgevoerd bij kamertemperatuur (17-25 °C) en de componenten moeten aan de volgende voorwaarden voldoen.

Compatibiliteitstest voor de teststof

13. Voordat de membraanbarrièretest wordt uitgevoerd moet een compatibiliteitstest worden verricht om te bepalen of de teststof door het CDS gedetecteerd kan worden. Als het CDS de teststof niet detecteert, is de testmethode op basis van de membraanbarrière niet geschikt voor het beoordelen van de mogelijke corrosiviteit van die teststof en moet er een andere testmethode worden gebruikt. Het CdS en de blootstellingsomstandigheden die voor de compatibiliteitstest worden gebruikt, moeten overeenkomen met de blootstelling in de daarop volgende membraanbarrièretest.

Tijdschaalcategorietest voor de teststof

14. Indien van toepassing voor de testmethode moet een teststof die geschikt is bevonden in de compatibiliteitstest, aan een tijdschaalcategorietest worden onderworpen, d.w.z. een screeningtest om onderscheid te maken tussen zwakke en sterke zuren of basen. Zo wordt in de gevalideerde referentietestmethode een tijdschaalcategorietest gebruikt om te bepalen welke van de twee tijdschalen moet worden gebruikt al naargelang een significante zuur- of alkalireserve wordt gedetecteerd. Er moeten twee verschillende doorbraaktijdschalen worden gebruikt voor het vaststellen van corrosiviteit en de VN-GHS-subcategorie voor huidcorrosiviteit, afhankelijk van de zuur- of alkalireserve van de teststof.

COMPONENTEN VAN DE TESTMETHODE OP BASIS VAN DE MEMBRAANBARRIÈRE

Membraanbarrière

15. De membraanbarrière bestaat uit twee componenten: een proteïneachtige, macromoleculaire, waterige gel en een permeabele dragermembraan. De proteïneachtige gel moet ondoordringbaar zijn voor vloeistoffen en vaste stoffen, maar kan gecorrodeerd en permeabel gemaakt worden. De volledig opgebouwde membraanbarrière moet worden bewaard onder van tevoren vastgestelde omstandigheden waarvan is uitgewezen dat de gel niet achteruitgaat, bv. door uitdrogen, groei van micro-organismen, verschuiven of barsten, wat ten koste zou gaan van de prestaties. De uiterste bewaartermijn moet worden vastgesteld en de membraanbarrièrepreparaten mogen na het verstrijken van die termijn niet meer worden gebruikt.

16. De permeabele dragermembraan levert mechanische ondersteuning aan de proteïneachtige gel gedurende het geleerproces en de blootstelling aan de teststof. De dragermembraan

moet doorzakken en verschuiven van de gel voorkomen en moet goed doorlatend zijn voor alle teststoffen.

17. De proteïneachtige gel, die bestaat uit proteïnen, bv. keratine, collageen of proteïnemengsels, die een gelmatrix vormen, dient als doelwit voor de teststof. Het proteïneachtige materiaal wordt op het oppervlak van de dragermembraan aangebracht en als het gegeleerd is, wordt de membraanbarrière over de indicatoroplossing geplaatst. De proteïneachtige gel moet een egale dikte en dichtheid hebben, zonder luchtbellen of gebreken die de functionele integriteit ervan zouden kunnen aantasten.

Chemisch detectiesysteem (CDS)

18. De indicatoroplossing, dezelfde oplossing als voor de compatibiliteitstest, moet reageren op de aanwezigheid van de teststof. Er moet een pH-indicator of een combinatie van indicatoren worden gebruikt, bv. cresolrood en methyloranje, die een kleurverandering laten zien in aanwezigheid van de teststof. Het meetsysteem kan zowel visueel of elektronisch zijn.

19. De detectiesystemen die worden ontwikkeld om te detecteren dat de teststof de barrièremembraan is gepasseerd, moeten worden beoordeeld op relevantie en betrouwbaarheid om de verzameling chemische stoffen die kan worden gedetecteerd, en de kwantitatieve detectiegrenzen aan te tonen.

TESTPRESTATIE

Opbouw van de componenten van de testmethode

20. De membraanbarrière wordt zodanig in een fles (of buis) met indicatoroplossing geplaatst dat de dragermembraan volledig in contact staat met de indicatoroplossing en er geen luchtbellen aanwezig zijn. Er moet zorgvuldig op worden toegezien dat de barrière volledig intact blijft.

Het aanbrengen van de teststof

21. Er wordt een passende hoeveelheid van de teststof, bv. 500 µl van een vloeistof of 500 mg van een fijn verpulverde vaste stof (7), in een egale laag over het oppervlak van de membraanbarrière aangebracht. Voor elke teststof worden een passend aantal duplo's, bv. vier (7), en de bijbehorende controles opgezet (zie de punten 23 tot en met 25). De tijd van het aanbrengen van de teststof op de membraanbarrière wordt geregistreerd. Om te waarborgen dat korte corrosietijden nauwkeurig worden geregistreerd, worden de aanbrengtijden van de teststof in de duploflessen gespreid.

Meting van de doordringing door de membraanbarrière

22. Elke fles wordt zorgvuldig in de gaten gehouden, de tijd van de eerste verandering in de indicatoroplossing, d.w.z. doordringing van de barrière, wordt geregistreerd en de tijd die is verstreken tussen het aanbrengen van de teststof en het doordringen door de membraanbarrière wordt bepaald.

Controles

23. In tests waarbij gebruikgemaakt wordt van een vehiculum of oplosmiddel met de teststof, moet het vehiculum of oplosmiddel compatibel zijn met het membraanbarrièresysteem, d.w.z. het membraanbarrièresysteem intact laten, en mag het de corrosiviteit van de teststof niet veranderen. Indien van toepassing moet er tegelijkertijd met de teststof een oplosmiddelcontrole (of vehiculumcontrole) worden getest om de compatibiliteit van het oplosmiddel/vehiculum met het membraanbarrièresysteem aan te tonen.

24. Om te beoordelen of het testsysteem op aanvaardbare wijze presteert moet er tegelijkertijd met de teststof ook een positieve (corrosieve) controle met matig corrosieve activiteit, bv. 110 ± 15 mg natriumhydroxide (VN-GHS-subcategorie voor corrosiviteit 1B) (7) worden getest. Een tweede positieve controle van dezelfde chemische klasse als de teststof kan nuttig zijn voor het beoordelen van de relatieve corrosiviteit van een corrosieve teststof. De gekozen positieve controle(s) moet(en) matig corrosief zijn (bv. VN-GHS-subcategorie voor corrosiviteit 1B) om veranderingen in de doordringingstijd te kunnen detecteren die mogelijk onaanvaardbaar veel langer of korter zijn dan de vastgestelde referentiewaarde, waaruit blijkt dat het testsysteem niet naar behoren werkt. Voor dit doel zijn extreem corrosieve (VN-GHS-subcategorie voor corrosiviteit 1A) of niet-corrosieve chemische stoffen van beperkt nut. Met een corrosieve VN-GHS-subcategorie 1B-stof kan een te snelle of te langzame doorbraaktijd wel gedetecteerd worden. Er kan een zwak corrosieve stof (VN-GHS-subcategorie voor corrosiviteit 1C) als positieve controle worden gebruikt om te meten in hoeverre de testmethode zwak corrosieve stoffen consistent kan onderscheiden van niet-corrosieve stoffen. Ongeacht de gevolgde aanpak moet er een aanvaardbaar responsbereik voor de positieve controle(s) worden vastgesteld op basis van het historische bereik van doorbraaktijden voor de gebruikte positieve controle(s), zoals het gemiddelde ±2-3 standaarddeviaties. In elk onderzoek moet de precieze doorbraaktijd voor de positieve controle worden bepaald, zodat afwijkingen buiten het aanvaardbare bereik gedetecteerd kunnen worden.

25. Als verdere kwaliteitscontrolemaatregel om de functionele integriteit van de membraanbarrière aan te tonen moet er tegelijkertijd met de teststof ook een negatieve (niet-corrosieve) controle, bv. 10 % citroenzuur, 6 % propionzuur (7), worden getest.

Aanvaardbaarheidscriteria voor het onderzoek

26. Volgens de vastgestelde tijdsparameters voor elk van de VN-GHS-subcategorieën voor corrosiviteit, moet de tijd (in minuten) die is verstreken tussen het aanbrengen van de

teststof op de membraanbarrière en het doordringen door de barrière worden gebruikt om de corrosiviteit van de teststof te voorspellen. Een onderzoek wordt alleen als aanvaardbaar beschouwd als de gelijktijdige positieve controle de verwachte responstijd voor doordringing (bv. een doorbraaktijd van 8-16 minuten voor natriumhydroxide indien gebruikt als positieve controle) oplevert, de gelijktijdige negatieve controle niet corrosief is en de gelijktijdige oplosmiddelcontrole, indien in het onderzoek opgenomen, niet corrosief is en evenmin de corrosiviteit van de teststof beïnvloedt. Voordat zij een methode routinematig gebruiken op een manier die aan deze testmethode voldoet, moeten laboratoria hun technische bekwaamheid aantonen aan de hand van de twaalf stoffen die in tabel 2 worden aanbevolen. Voordat nieuwe soortgelijke "me too"-methoden die worden ontwikkeld op basis van deze testmethode en die structureel en functioneel vergelijkbaar zijn met de gevalideerde referentiemethode (14) worden gebruikt met het oog op regelgeving, moeten de vooraf vastgestelde prestatienormen worden gebruikt om de betrouwbaarheid en nauwkeurigheid van de nieuwe methode aan te tonen (10).

Interpretatie van resultaten en indeling van de teststoffen

27. De tijd (in minuten) die is verstreken tussen het aanbrengen van de teststof op de membraanbarrière en het doordringen door de barrière wordt gebruikt om de teststof in te delen in een van de VN-GHS-subcategorieën voor corrosie (1) en, indien van toepassing, een VN-verpakkingsgroep (16). Voor elke voorgestelde testmethode worden de drempeltijden vastgesteld, die als scheiding fungeren tussen elk van de drie subcategorieën voor corrosie. Bij de uiteindelijke beslissing over de drempeltijden moet de noodzaak om onderclassificatie van het corrosiegevaar (d.w.z. vals-negatieve uitkomsten) te voorkomen, in aanmerking worden genomen. In deze testrichtlijn moeten de drempeltijden voor Corrositex® zoals beschreven in tabel 3 worden gebruikt, omdat dit vooralsnog de enige testmethode is die onder deze testrichtlijn valt (7).

Tabel 3: Corrositex®-voorspellingsmodel

Gemiddelde doorbraaktijd (minuten)		**VN-GHS-prognose[3]**
Categorie 1-teststoffen[1] (bepaald door de categorietest van de methode)	**Categorie 2-teststoffen[2] (bepaald door de categorietest van de methode)**	
0-3 min.	0-3 min.	**Corrosief optionele subcategorie 1A**
> 3 tot 60 min.	> 3 tot 30 min.	**Corrosief optionele subcategorie 1B**
> 60 tot 240 min.	> 30 tot 60 min.	**Corrosief optionele subcategorie 1C**

> 240 min.	> 60 min.	**Niet-corrosief**

[1] Teststoffen met een hoge zuur/alkalireserve (6)

[2] Teststoffen met een lage zuur/alkalireserve (6)

[3] VN-GHS-subcategorieën 1A, 1B en 1C komen overeen met respectievelijk VN-verpakkingsgroepen I, II en III

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

28. Voor de teststof en de positieve controle(s) moet de tijd (in minuten) die verstrijkt tussen het aanbrengen en het doordringen door de barrière, in tabelvorm worden gerapporteerd, zowel de afzonderlijke gegevens per duplo als het gemiddelde ± de standaarddeviatie voor elke bepaling.

Testverslag

29. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof en controlestoffen:

- stof die uit één component bestaat: chemische identificatiegegevens, zoals IUPAC- of CAS-naam, CAS-nummer, SMILES- of InChI-code, structuurformule, zuiverheid, chemische identiteit van onzuiverheden, indien van toepassing en praktisch haalbaar enz.;
- stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB en mengsel: voor zover mogelijk, karakterisering aan de hand van chemische identiteit (zie hierboven), kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen van de bestanddelen;
- fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water en aanvullende relevante fysisch-chemische eigenschappen;
- bron, partijnummer indien beschikbaar;
- behandeling van de teststof/controlestof voorafgaand aan het testen, indien van toepassing (bv. opwarming, malen);
- stabiliteit van de teststof, uiterste gebruiksdatum, of datum voor heranalyse, indien bekend;
- bewaaromstandigheden.

Vehiculum:

- identificatiegegevens, de concentratie (indien van toepassing) en het gebruikte volume;
- een motivering voor de keuze van het vehiculum.

In-vitromodel op basis van de membraanbarrière en toegepast protocol, waaronder de aangetoonde nauwkeurigheid en betrouwbaarheid

Testomstandigheden:

- beschrijving van de gebruikte apparatuur en voorbereidingsprocedures;
- herkomst en samenstelling van de gebruikte in-vitromembraanbarrière;
- samenstelling en eigenschappen van de indicatoroplossing;
- detectiemethode;
- hoeveelheden van teststof en controlestoffen;
- aantal duplo's;
- een beschrijving en rechtvaardiging van de tijdschaalcategorietest;
- opbrengmethode;
- waarnemingstijden;
- een beschrijving van de toegepaste beoordelings- en indelingscriteria;
- aantoning van bekwaamheid in de toepassing van de testmethode voorafgaand aan routinematig gebruik door middel van het testen van de chemische stoffen voor bekwaamheidstoetsing.

Resultaten:

- een tabel met afzonderlijke ruwe gegevens van afzonderlijke test- en controlemonsters voor elke duplo;
- beschrijvingen van andere waargenomen effecten;
- de afgeleide indeling met vermelding van het gebruikte voorspellingsmodel/de gehanteerde beslissingscriteria.

Bespreking van de resultaten

Conclusies

LITERATUUR

(1) Verenigde Naties (VN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), First Revised Edition, VN New York en Genève, 2013. Beschikbaar op: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Hoofdstuk B.4 van deze bijlage, Acute huidirritatie/corrosie.

(3) Hoofdstuk B.40 bis van deze bijlage, In-vitrohuidcorrosie: testmethode met gereconstrueerde humane epidermis (RhE).

(4) Hoofdstuk B.40 van deze bijlage, In-vitrohuidcorrosie: transcutane elektrische weerstand (TEW).

(5) OESO (2015). Guidance document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203). Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, 483-524.

(7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495.)

(8) Gordon V.C., Harvell J.D. and Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37-45.

(9) OESO (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Series on Testing and Assessment, no. Series on Testing and Assessment (No 34).

(10) OESO (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs. Beschikbaar op: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf.

(11) CEVMA (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15e vergadering van het raadgevend wetenschappelijk comité van het Europees Centrum voor de validatie van alternatieve methoden (ESAC), Ispra, Italië. ATLA 29, 96-97.

(12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (September 20, 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) Hoofdstuk B.46 van deze bijlage, In-vitrohuidirritatie: testmethode met gereconstrueerde humane epidermis. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Beschikbaar op: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Beschikbaar op: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) Verenigde Naties (VN) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods (aanbevelingen van de VN inzake het vervoer van gevaarlijke goederen), modelreglementen, 18e herziene editie (Deel, Hoofdstuk 2.8), Verenigde Naties, 2013. Beschikbaar op: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Aanhangsel

DEFINITIES

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een testmethode, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden uitgevoerd. De betrouwbaarheid wordt beoordeeld door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid (9).

Chemisch detectiesysteem (CDS): een visueel of elektronisch meetsysteem met een indicatoroplossing die reageert op de aanwezigheid van een teststof, bv. door een verandering in een pH-indicator of een combinatie van indicatoren, die een kleurverandering laten zien in aanwezigheid van de teststof, of door andere typen chemische of elektrochemische reacties.

Chemische stof: een stof of een mengsel.

Concordantie: dit is een maat voor de prestaties van de testmethode voor testmethoden die een categoriale uitkomst geven en het is één aspect van relevantie. Deze term en de term "nauwkeurigheid" worden soms door elkaar gebruikt; de term wordt gedefinieerd als het percentage van alle geteste chemische stoffen die correct als positief of negatief worden geclassificeerd. De concordantie is sterk afhankelijk van de prevalentie van positieven in de typen teststoffen die worden onderzocht (9).

Gevoeligheid: het percentage van alle positieve/actieve chemische stoffen dat door middel van de testmethode correct wordt ingedeeld. Dit is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert en is een belangrijke factor voor de beoordeling van de relevantie van een testmethode (9).

GHS (mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen): een systeem voor de indeling van chemische stoffen (stoffen en mengsels) op basis van gestandaardiseerde soorten en niveaus van gevaren van fysische aard en gevaren voor de gezondheid en het milieu, en dat de desbetreffende voorlichtingselementen bepaalt, zoals pictogrammen, signaalwoorden, gevarenaanduidingen, voorzorgsmaatregelen en veiligheidsinformatiebladen, waarmee informatie over de schadelijke effecten van de stoffen kenbaar wordt gemaakt teneinde mensen (waaronder werkgevers, werknemers, transporteurs, consumenten en spoedhulpverleners) en het milieu te beschermen (1).

Huidcorrosie in vivo: het ontstaan van een irreversibele beschadiging van de huid, namelijk zichtbare necrose door de epidermis heen in de dermis, na het aanbrengen van een teststof gedurende ten hoogste vier uur. Corrosie-reacties worden gekenmerkt door zweren, bloedingen, bloedkorsten en, tegen het eind van de observatieperiode van 14 dagen, ontkleuring door bleking van de huid, gebieden met volledige haaruitval en littekens. Om twijfelachtig letsel te evalueren moet histopathologie worden overwogen.

IATA: Integrated Approach on Testing and Assessment (geïntegreerde test- en beoordelingsbenadering).

Mengsel: een mengsel of oplossing bestaande uit twee of meer stoffen.

Nauwkeurigheid: de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de testmethode en erkende referentiewaarden. Dit is een maat voor de prestaties van de testmethode en één aspect van relevantie. Deze term en de term "concordantie", waaronder het percentage correcte uitkomsten van een testmethode wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt (9).

NC: niet-corrosief.

Prestatienormen: normen, gebaseerd op een gevalideerde testmethode, die de basis vormen voor de beoordeling van de vergelijkbaarheid van een voorgestelde, in mechanistisch en functioneel opzicht gelijksoortige testmethode. Hieronder begrepen zijn: i) essentiële componenten van de testmethode; ii) een minimumlijst van referentiestoffen die zijn gekozen uit de stoffen die zijn gebruikt om de aanvaardbare prestaties van de gevalideerde testmethode aan te tonen; en iii) de soortgelijke betrouwbaarheids- en nauwkeurigheidsniveaus die door de voorgestelde testmethode moeten worden gehaald wanneer ze worden beoordeeld aan de hand van de minimumlijst van referentiestoffen; deze waarden zijn gebaseerd op de waarden die voor de gevalideerde testmethode zijn verkregen (9).

Relevantie: beschrijving van het verband van de testmethode met het te onderzoeken effect en of de test betekenis heeft en nuttig is voor een bepaald doel. Het is de mate waarin de testmethode het te onderzoeken biologische effect correct meet of voorspelt. Relevantie omvat een beoordeling van de nauwkeurigheid (concordantie) van een testmethode (9).

Specificiteit: het percentage van alle negatieve/niet-actieve chemische stoffen dat door middel van de testmethode correct wordt ingedeeld. Dit is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert en is een belangrijke factor voor de beoordeling van de relevantie van een testmethode (9).

Stof: een chemisch element en de verbindingen ervan, zoals zij voorkomen in natuurlijke toestand of bij de productie ontstaan, met inbegrip van alle additieven die nodig zijn voor het behoud van de stabiliteit ervan en alle onzuiverheden ten gevolge van het toegepaste procedé, doch met uitzondering van elk oplosmiddel dat kan worden afgescheiden zonder aantasting van de stabiliteit van de stof of wijziging van de samenstelling ervan.

Stof die uit één component bestaat: een stof die wordt gekenmerkt door haar kwantitatieve samenstelling en waarin een hoofdcomponent aanwezig is in een concentratie van ten minste 80 % (w/w).

Stof die uit meerdere componenten bestaat: een stof die wordt gekenmerkt door haar kwantitatieve samenstelling en waarin meer dan één hoofdcomponent aanwezig is in een concentratie van $\geq$ 10 % (w/w) en $<$ 80 % (w/w). Een stof die uit meerdere componenten bestaat, is het resultaat van een fabricageproces. Het verschil tussen mengsels en stoffen die uit meerdere componenten bestaan, is dat mengsels worden verkregen door twee of meer stoffen zonder chemische reactie met elkaar te vermengen. Een stof die uit meerdere componenten bestaat, is het resultaat van een chemische reactie.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

UVCB: stoffen met een onbekende of variabele samenstelling, complexe reactieproducten en biologische materialen.

B.66 IN-VITROBEPALINGEN OP BASIS VAN STABIELE TRANSFECTIE EN TRANSACTIVATIE VOOR HET OPSPOREN VAN OESTROGEENRECEPTORAGONISTEN EN -ANTAGONISTEN

ALGEMENE INLEIDING

Op prestaties gebaseerde testrichtlijn van de OESO

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 455 (2016) van de OESO. TG 455 is een op prestaties gebaseerde testrichtlijn (performance-based test guideline, PBTG), waarin de methodologie wordt beschreven van in-vitrobepalingen op basis van stabiele transfectie en transactivatie voor het opsporen van oestrogeenreceptoragonisten en -antagonisten (estrogen receptor transactivation assays, ER TA-bepalingen). De PBTG omvat verschillende, in mechanistisch en functioneel opzicht gelijksoortige testmethoden voor het identificeren van agonisten en antagonisten van de oestrogeenreceptor (ERα, en/of ERβ) en moet de ontwikkeling bevorderen van nieuwe gelijksoortige of gewijzigde testmethoden die overeenstemmen met de valideringsbeginselen beschreven in de OESO-leidraad voor de validering en internationale aanvaarding van nieuwe of bijgewerkte testmethoden voor gevarenbeoordeling (Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment) (1) De volledig gevalideerde referentietestmethoden (aanhangsels 2 en 3) die de basis vormen voor deze PBTG zijn:

- de bepaling op basis van stabiele transfectie en transactivatie (STTA-bepaling) (2) die gebruikmaakt van de cellijn (h) ERα-HeLa-9903; en
- de VM7Luc-ER TA-bepaling (3) waarbij gebruikgemaakt wordt van de cellijn VM7Luc4E2[1], een cellijn die voornamelijk hERα tot expressie brengt met enige bijdrage van hERβ (4) (5).

Voor de ontwikkeling en validering van gelijksoortige bepalingen voor hetzelfde gevareneindpunt zijn prestatienormen (6) (7) beschikbaar en moeten deze worden

[1] Tot juni 2016 werd deze cellijn aangeduid als BG1Luc. BG-1-cellen werden voor het eerst beschreven door Geisinger et al. (1998) (35) en werden later gekarakteriseerd door onderzoekers verbonden aan het Amerikaanse National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (36). Vrij recentelijk werd ontdekt dat er twee verschillende varianten bestaan van de BG-1-cellen die door onderzoekers worden gebruikt: BG-1 FR en BG-1 NIEHS. Een uitvoerige analyse, inclusief DNA-tests, van deze twee BG-1-cellijnvarianten, uitgevoerd door Li et al. (2014) (37) wees uit dat BG-1 FR uniek was, terwijl BG-1 NIEHS, de oorspronkelijke cellijn die werd gebruikt bij de ontwikkeling van de bepaling, niet de humane ovariumcarcinoomcellijn BG1 was, maar een variant van de humane borstkankercellijn MCF7. De in de bepaling gebruikte cellijn, die oorspronkelijk werd aangeduid als BG1Luc4E2 (38), zal voortaan VM7Luc4E2 worden genoemd ("V"= variant; "M7" = MCF7-cellen). Evenzo komt de bepaling nu VM7Luc-ER TA-bepaling te heten. Hoewel dit de herkomst van de cellijn waarop de bepaling is gebaseerd, verandert, heeft het geen invloed op de gepubliceerde valideringsstudies, noch op de bruikbaarheid en de toepassing van deze bepaling voor de screening van oestrogene/anti-oestrogene chemische stoffen.

gebruikt. Ze zorgen dat PBTG 455 snel gewijzigd kan worden, zodat nieuwe gelijksoortige bepalingen aan een bijgewerkte PBTG kunnen worden toegevoegd. Gelijksoortige bepalingen zullen evenwel pas worden toegevoegd nadat de OESO ze heeft beoordeeld en onderschrijft dat aan de prestatienormen wordt voldaan. De in TG 455 opgenomen bepalingen kunnen zonder onderscheid worden gebruikt om te voldoen aan de eisen die aan OESO-landen worden gesteld wat betreft de testresultaten voor transactivatie van de oestrogeenreceptor, en in aanmerking te komen voor wederzijdse aanvaarding van gegevens in overeenstemming met de OESO-overeenkomst.

Achtergrond en beginselen van de bepalingen die in deze testmethode worden beschreven

2. In 1998 is de OESO met hoge prioriteit een actie gestart om bestaande testrichtlijnen te herzien en nieuwe testrichtlijnen te ontwikkelen voor het screenen en testen op potentiële hormoonontregelaars. Het conceptueel kader van de OESO voor het testen en beoordelen van hormoonontregelende stoffen werd in 2012 herzien. Het oorspronkelijke en het herziene conceptueel kader zijn als bijlagen opgenomen bij de OESO-leidraad voor gestandaardiseerde testrichtlijnen voor de beoordeling van chemische stoffen op hormoonontregeling (Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption) (8). Het conceptueel kader omvat vijf niveaus, die elk overeenkomen met een ander niveau van biologische complexiteit. De in deze testmethode beschreven ER TA-bepalingen zijn ingedeeld op niveau 2: "*in-vitrobepalingen die gegevens moeten opleveren over (een) geselecteerde endocriene mechanisme(n)/weg(en).*" Dit is een testmethode voor in-vitrobepalingen op basis van transactivatie (TA), die zijn ontworpen om agonisten en antagonisten van de oestrogeenreceptor (ER) te identificeren.

3. De interactie van oestrogenen met ER's kan de transcriptie van oestrogeengestuurde genen beïnvloeden, wat kan leiden tot de inductie of remming van processen in de cel, waaronder de processen die nodig zijn voor celproliferatie, de normale ontwikkeling van de foetus en de voortplantingsfunctie (9) (10) (11). Verstoring van de normale oestrogene systemen zou kunnen leiden tot schadelijke effecten op de normale ontwikkeling (ontogenese), de reproductieve gezondheid en de integriteit van het voortplantingsstelsel.

4. In-vitro-TA-bepalingen zijn gebaseerd op een directe of indirecte interactie van de stoffen met een specifieke receptor die de transcriptie van een reportergenproduct reguleert. Dergelijke bepalingen zijn veel gebruikt voor de beoordeling van de genexpressie die wordt gereguleerd door specifieke kernreceptoren zoals ER's (12) (13) (14) (15) (16). Ze zijn voorgesteld voor het opsporen van door de ER gereguleerde oestrogene transactivatie (17) (18) (19). Er zijn ten minste twee belangrijke subtypen kern-ER's, α en β, die door afzonderlijke genen gecodeerd worden. De bijbehorende eiwitten hebben elk hun eigen biologische functies en verschillende weefseldistributies en bindingsaffiniteiten voor liganden (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). De kern-ERα medieert de klassieke oestrogeenrespons (27)

(28) (29) (30) en daarom zijn de meeste modellen die op dit moment worden ontwikkeld voor het meten van ER-activatie of -remming, specifiek voor ERα. De bepalingen worden gebruikt voor het identificeren van chemische stoffen die de ER activeren (of remmen) na binding van een ligand. Het receptor-ligand-complex bindt vervolgens aan specifieke DNA-responselementen en transactiveert een reportergen, wat leidt tot een verhoogde cellulaire expressie van een markereiwit. Er kunnen in deze bepalingen verschillende reporterresponsen worden gebruikt. In op luciferase gebaseerde systemen zet het enzym luciferase het substraat luciferine om in een bioluminescent product dat kwantitatief bepaald kan worden met een luminometer. Andere voorbeelden van veel gebruikte reporters zijn fluorescent proteïne en het gen *LacZ*, dat codeert voor β-galactosidase, een enzym dat het kleurloze substraat X-gal (5- broom-4-chloor-indolyl-galactopyranoside) kan omzetten in een blauw product dat kwantitatief bepaald kan worden met een spectrofotometer. Deze reporters kunnen snel en goedkoop worden bepaald met behulp van in de handel verkrijgbare testkits.

5. De relevantie en de betrouwbaarheid van de STTA-bepaling en de VM7Luc TA-bepaling voor het beoogde doel zijn aangetoond in de valideringsstudies voor deze bepalingen (3) (4) (5) (30). Prestatienormen voor op luminescentie gebaseerde ER TA-bepalingen met borstcellijnen zijn opgenomen in het evaluatieverslag "ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc-ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals" (3). Deze prestatienormen zijn aangepast om te kunnen worden toegepast voor zowel de STTA-bepaling als de bepaling met VM7Luc (2).

6. De in deze testmethode gebruikte definities en afkortingen staan in aanhangsel 1.

Toepassingsgebied en beperkingen voor de TA-bepalingen

7. Deze bepalingen worden aangereikt ten behoeve van screening en prioritering, maar kunnen ook mechanistische informatie verschaffen die kan worden gebruikt in een benadering met meervoudige bewijsvoering ("weight of evidence"-benadering). De tests berusten op de transactivatie die wordt geïnduceerd door chemische binding aan de ER's in een in-vitrosysteem. De resultaten mogen dan ook niet rechtstreeks geëxtrapoleerd worden naar de complexe signalering en regulering van het intacte endocriene systeem in vivo.

8. Door de ER's gemedieerde transactivatie wordt beschouwd als een van de voornaamste mechanismen voor hormoonontregeling, hoewel er ook andere mechanismen zijn waardoor hormoonontregeling kan optreden, waaronder i) interacties met andere receptoren en enzymsystemen in het endocriene systeem, ii) hormoonsynthese, iii) metabole activering en/of inactivering van hormonen, iv) verdeling van hormonen naar doelweefsels, en v) klaring van hormonen uit het lichaam. In geen van de bepalingen die onder deze testmethode vallen, worden deze werkingsmechanismen in aanmerking genomen.

9. Deze testmethode richt zich op het vermogen van chemische stoffen om van de ER afhankelijke transcriptie te activeren (d.w.z. als een agonist op te treden) en ook te onderdrukken (d.w.z. als een antagonist op te treden). Sommige chemische stoffen kunnen, afhankelijk van het gebruikte celtype, zowel agonistische als antagonistische activiteit vertonen en staan bekend als selectieve oestrogeenreceptormodulatoren (SERM's). Overwogen kan worden om chemische stoffen met een negatieve respons in deze bepalingen aan een ER-bindingsbepaling te onderwerpen, alvorens te concluderen dat de chemische stof niet aan de receptor bindt. Bovendien geven de bepalingen slechts een waarschijnlijke indicatie over de activiteit van de uitgangsstof, rekening houdend met het beperkte metabole vermogen van de in-vitrocelsystemen. Aangezien bij de validering alleen zuivere stoffen zijn gebruikt, zijn er geen gegevens over de toepasbaarheid voor testmengsels. In theorie is de testmethode echter wel toepasbaar voor het testen van stoffen die uit meerdere componenten bestaan, UVCB's en van mengsels. Voordat de testmethode wordt gebruikt op een stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB of mengsel om gegevens te genereren voor een beoogd regelgevingsdoel, moet worden nagegaan of, en zo ja, waarom deze methode betrouwbare resultaten oplevert voor dat doel. Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is.

10. Ter informatie worden in tabel 1 de resultaten van agonismetests weergegeven voor de 34 stoffen die zijn getest in de beide volledig gevalideerde referentietestmethoden die in deze testmethode worden beschreven. Op basis van de gepubliceerde verslagen, waaronder in-vitrobepalingen voor ER-binding en TA en/of de uterotrofe test, zijn 26 van deze stoffen ingedeeld als definitieve ER-agonisten en 8 als negatief (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34). In tabel 2 worden de resultaten van antagonismetests weergegeven voor de 15 stoffen die zijn getest in de beide volledig gevalideerde referentietestmethoden die in deze testmethode worden beschreven. Op basis van de gepubliceerde verslagen, waaronder in-vitrobepalingen voor ER-binding en TA, zijn 4 van deze stoffen ingedeeld als definitieve/waarschijnlijke ER-antagonisten en 10 als negatief (2) (3) (18) (31). Wat betreft de gegevens die zijn weergegeven in tabel 1 en tabel 2 was er 100 % overeenstemming tussen de beide referentietestmethoden over de indeling van alle stoffen, behalve voor één stof (Mifepriston) voor de antagonismebepaling, en elke stof werd correct ingedeeld als ER-(ant)agonist of negatief. Nadere informatie over deze groep chemische stoffen en over de aanvullende chemische stoffen die tijdens de valideringsstudies voor de STTA-bepaling en de VM7Luc-ER TA-bepaling getest zijn, is te vinden in de prestatienormen voor de ER TA (6) (7), aanhangsel 2 (tabellen 1, 2 en 3).

Tabel 1: Overzicht van de resultaten van de STTA-bepaling en de VM7Luc-ER TA-bepaling voor stoffen die aan beide agonismebepalingen zijn onderworpen en zijn ingedeeld als ER-agonisten (POS) of negatief (NEG).

	Stof	CAS RN	STTA-bepaling[1]			VM7Luc-ER TA-bepaling[2]		Bron van gegevens voor indeling[4]		
			ER TA -activiteit	PC_{10}-waarde (M)	PC_{50}-waarde[b] (M)	ER TA-activiteit	EC_{50}-waarde[b,3] (M)	Andere ER TA-tests[c]	ER Bindmiddel	Uterotroof
1	17β-Oestradiol[a]	50-28-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$5{,}63 \times 10^{-12}$	POS (227/227)	POS	POS
2	17α-Oestradiol[a]	57-91-0	POS	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}40 \times 10^{-9}$	POS (11/11)	POS	POS
3	17α-Ethinyloestradiol[a]	57-63-6	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$7{,}31 \times 10^{-12}$	POS (22/22)	POS	POS
4	17β-Trenbolon	10161-33-8	POS	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	POS	$4{,}20 \times 10^{-8}$	POS (2/2)	NT	NT
5	19-Nortestosteron[a]	434-22-0	POS	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}80 \times 10^{-6}$	POS (4/4)	POS	POS
6	4-Cumylfenol	599-64-4	POS	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}20 \times 10^{-7}$	POS (5/5)	POS	NT
7	4-*tert*-Octylfenol	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	POS	$3{,}19 \times 10^{-8}$	POS (21/24)	POS	POS
8	Apigenine[a]	520-36-5	POS	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS (26/26)	POS	NT
9	Atrazine[a]	1912-24-9	NEG	-	-	NEG	-	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Bisfenol A[a]	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	POS	$5{,}33 \times 10^{-7}$	POS (65/65)	POS	POS
11	Bisfenol B[a]	77-40-7	POS	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}95 \times 10^{-7}$	POS (6/6)	POS	POS
12	Butylbenzylftalaat[a]	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}98 \times 10^{-6}$	POS (12/14)	POS	NEG
13	Corticosteron[a]	50-22-6	NEG	-	-	NEG	-	NEG (6/6)	NEG	NT
14	Coumestrol[a]	479-13-0	POS	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	POS	$1{,}32 \times 10^{-7}$	POS (30/30)	POS	NT
15	Daidzeïne[a]	486-66-8	POS	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	POS	$7{,}95 \times 10^{-7}$	POS (39/39)	POS	POS
16	Diëthylstilboestrol[a]	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	POS	$3{,}34 \times 10^{-11}$	POS (42/42)	POS	NT
17	Di-*n*-butylftalaat	84-74-2	POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$		POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$	POS (6/11)	POS	NEG
18	Ethylparabeen	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(geen PC_{50})	POS	$2{,}48 \times 10^{-5}$	POS		NT
19	Oestron	53-16-7	POS	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	POS	$2{,}34 \times 10^{-10}$	POS (26/28)	POS	POS
20	Genisteïne[a]	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	POS	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS (100/102)	POS	POS
21	Haloperidol	52-86-8	NEG	-	-	NEG	-	NEG (2/2)	NEG	NT
22	Kaempferol[a]	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}99 \times 10^{-6}$	POS (23/23)	POS	NT
23	Kepone[a]	143-50-0	POS	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS (14/18)	POS	NT
24	Ketoconazool	65277-42-1	NEG	-	-	NEG	-	NEG (2/2)	NEG	NT

25	Linuron	330-55-2	NEG	-	-	NEG	-	NEG (8/8)	NEG	NT
26	*meso*-Hexestrol[a]	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	POS	$1{,}65 \times 10^{-11}$	POS (4/4)	POS	NT
27	Methyltestosteron[a]	58-18-4	POS	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}68 \times 10^{-6}$	POS (5/6)	POS	NT
28	Morine	480-16-0	POS	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}37 \times 10^{-6}$	POS (2/2)	POS	NT
29	Noretynodrel[a]	68-23-5	POS	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	POS	$9{,}39 \times 10^{-10}$	POS (5/5)	POS	NT
30	*p,p'*-Methoxychloor[a]	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(geen PC^{50})[b]	POS	$1{,}92 \times 10^{-6}$	POS (24/27)	POS	POS
31	Fenobarbital[a]	57-30-7	NEG	-	-	NEG	-	NEG (2/2)	NEG	NT
32	Reserpine	50-55-5	NEG	-	-	NEG	-	NEG (4/4)	NEG	NT
33	Spironolacton[a]	52-01-7	NEG	-	-	NEG	-	NEG (4/4)	NEG	NT
34	Testosteron	58-22-0	POS	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}75 \times 10^{-5}$	POS (5/10)	POS	NT

Afkortingen: CAS RN = registratienummer van de Chemical Abstract Service; M = molair; EC_{50} = effectieve-concentratiemediaan van de teststof; NEG = negatief; POS = positief; NT = niet getest; PC_{10} (en PC_{50}) = de concentratie van een teststof waarbij de respons gelijk is aan 10 % (of 50 % voor de PC_{50}) van de respons die wordt opgewekt door de positieve controle (E2, 1 nM) op elke plaat.

[a]Gangbare stoffen die op basis van de STTA-bepaling en de VM7Luc-ER TA-bepaling zijn aangewezen als ER-agonisten of negatief en die in de valideringsstudie voor de VM7Luc-ER TA-bepaling zijn gebruikt ter beoordeling van de nauwkeurigheid (ICCVAM-evaluatieverslag over de VM7Luc-ER TA-bepaling, tabel 4-1) (3).

[b]De maximale testconcentratie zonder beperkingen als gevolg van cytotoxiciteit of onoplosbaarheid was 1×10^{-5} M (STTA-bepaling) en 1×10^{-3} M (VM7Luc-ER TA-bepaling).

[c]De cijfers tussen haakjes staan voor het aantal als positief (POS) of negatief (NEG) ingedeelde testresultaten ten opzichte van het totale aantal geraadpleegde onderzoeken.

[1]Waarden zoals gerapporteerd in het document "Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line" (2).

[2]ICCVAM-evaluatieverslag "ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc-ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3)".

[3]De gemiddelde EC_{50}-waarden werden berekend aan de hand van de waarden zijn gerapporteerd door de laboratoria die betrokken waren bij de valideringsstudie voor de VM7Luc-ER TA-bepaling (XDS, CEVMA en Hiyoshi) (3).

[4]De stoffen zijn als ER-agonist of negatief ingedeeld op basis van gegevens uit de Background Review Documents (BRD) van het ICCVAM over testmethoden voor ER-binding en TA (31) en gegevens uit publicaties die na deze BRD's zijn gepubliceerd en gereviewd (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Opmerkingen: Niet voor elke bepaling die onder deze testmethode valt, worden dezelfde meetwaarden gebruikt. In sommige gevallen kan de EC_{50} niet worden berekend omdat er geen volledige dosis-responscurve gegenereerd wordt. Bij de SSTA-bepaling is de PC_{10}-waarde een belangrijke meetwaarde, maar er kunnen ook voorbeelden zijn waarvoor een PC_x nuttige informatie geeft.

Tabel 2: Vergelijking van de resultaten van de STTA-bepaling en de VM7Luc-ER TA-bepaling voor stoffen die aan beide antagonismebepalingen zijn onderworpen en zijn ingedeeld als ER-antagonisten (POS) of negatief (NEG).

	Stof[a]	CAS RN	ER STTA-bepaling[1]		VM7Luc-ER TA-bepaling[2]		Verwachte effecten van de ER STTA[4]	Consensuele indeling door het ICCVAM[5]	Chemische klasse volgens de MeSH[6]	Productcategorie[7]
			ER TA -activiteit	IC_{50}-waarde[b] (M)	ER TA -activiteit	IC_{50}-waarde[b,3] (M)				
1	4-Hydroxytamoxifen	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	matig POS	POS	Koolwaterstof (cyclisch)	Geneesmiddel
2	Dibenzo[*a*,*h*]antraceen	53-70-3	POS	Geen IC_{50}	POS	Geen IC_{50}	POS	PP	Polycyclische verbinding	Laboratoriumstof, natuurlijk product
3	Mifepriston	84371-65-3	POS	$5{,}61 \times 10^{-6}$	NEG	-	mild POS	NEG	Steroïde	Geneesmiddel
4	Raloxifeen HCl	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	matig POS	POS	Koolwaterstof (cyclisch)	Geneesmiddel
5	Tamoxifen	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	POS	POS	Koolwaterstof (cyclisch)	Geneesmiddel
6	17β-oestradiol	50-28-2	NEG	-	NEG	-	PN	PN	Steroïde	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
7	Apigenine	520-36-5	NEG	-	NEG	-	NEG	NEG	Heterocyclische verbinding	Kleurstof, natuurlijk product, farmaceutisch tussenproduct
8	Atrazine	1912-24-9	NEG	-	NEG	-	NEG	PN	Heterocyclische verbinding	Herbicide
9	Di-*n*-butylftalaat	84-74-2	NEG	-	NEG	-	NEG	NEG	Ester, ftaalzuur	Cosmetisch bestanddeel, industriële chemische stof, weekmaker
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	-	NEG	-	niet getest	PN	Heterocyclische verbinding, pyrimidine	Fungicide
11	Flavon	525-82-6	NEG	-	NEG	-	PN	PN	Flavonoïde, heterocyclische verbinding	Natuurlijk product, geneesmiddel
12	Flutamide	13311-84-7	NEG	-	NEG	-	NEG	PN	Amide	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
13	Genisteïne	446-72-0	NEG	-	NEG	-	PN	NEG	Flavonoïde, heterocyclische verbinding	Natuurlijk product, geneesmiddel
14	*p*-*n*-nonylfenol	104-40-5	NEG	-	NEG	-	niet getest	NEG	Fenol	Chemisch tussenproduct

15	Resveratrol	501-36-0	NEG	-	NEG	-	PN	NEG	Koolwaterstof (cyclisch)	Natuurlijk product

Afkortingen: CAS RN = registratienummer van de Chemical Abstract Service; M = molair; IC_{50} = concentratie van de teststof die 50 % remming veroorzaakt NEG = negatief; PN = beschouwd als negatief; POS = positief; PP = beschouwd als positief.

[a]Gangbare stoffen die op basis van de STTA-bepaling en de VM7Luc-ER TA-bepaling zijn aangewezen als ER-antagonisten of negatief en die in de valideringsstudie voor de VM7Luc-ER TA-bepaling zijn gebruikt ter beoordeling van de nauwkeurigheid (2) (3).

[b]De maximale testconcentratie zonder beperkingen als gevolg van cytotoxiciteit of onoplosbaarheid was 1×10^{-3} M (STTA-bepaling) en 1×10^{-5} M (VM7Luc-ER TA-bepaling).

[1]Waarden zoals gerapporteerd in het "Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2)".

[2]ICCVAM-evaluatieverslag "ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc-ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3)".

[3]De gemiddelde EC_{50}-waarden werden berekend aan de hand van de waarden zijn gerapporteerd door de laboratoria die betrokken waren bij de valideringsstudie voor de VM7Luc-ER TA-bepaling (XDS, CEVMA en Hiyoshi) (3).

[4]Verwachte ER STTA-activiteit op basis van gerapporteerde effecten die bekend zijn uit historische gegevens van het Japanse Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI) over de ER-bindingsbepaling, de uterotrofe test en informatie verzameld uit de beschikbare literatuur (2).

[5]De stoffen zijn als ER-antagonist of negatief ingedeeld op basis van gegevens uit de Background Review Documents (BRD) van het ICCVAM over bepalingen voor ER-binding en TA (31) en gegevens uit publicaties die na deze BRD's zijn gepubliceerd en gereviewd (2) (3) (18) (31).

[6]De stoffen werden ingedeeld in een of meer chemische klassen aan de hand van de Medical Subject Headings (MeSH) van de Amerikaanse National Library of Medicine, een internationaal erkend gestandaardiseerd classificatiesysteem (beschikbaar op http://www.nlm.nih.gov/mesh).

[7]De stoffen werden ingedeeld in een of meer productcategorieën aan de hand van de Hazardous Substances Data Bank van de Amerikaanse National Library of Medicine (beschikbaar op http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

COMPONENTEN VAN DE ER TA-BEPALING

Essentiële componenten van de bepaling

11. Deze testmethode is van toepassing op bepalingen waarbij gebruikgemaakt wordt van een stabiel getransfecteerde of endogene ERα receptor en een stabiel getransfecteerd reportergenconstruct gestuurd door een of meer oestrogeenresponselementen. Er kunnen evenwel ook andere receptoren aanwezig zijn, zoals ERβ. Dit zijn essentiële componenten van de bepaling.

Controles

12. Voor elke agonisme- en antagonismebepaling moet de keuze van de gelijktijdige referentiestandaarden worden onderbouwd. Gelijktijdige controles (negatieve controle, oplosmiddelcontrole en positieve controle), voor zover van toepassing, dienen als indicatie dat de bepaling werkt onder de testomstandigheden, en zorgen dat de verschillende experimenten met elkaar vergeleken kunnen worden. Ze maken doorgaans deel uit van de aanvaardbaarheidscriteria voor een bepaald experiment (1).

Standaard kwaliteitscontroleprocedures

13. De standaard kwaliteitscontroleprocedures moeten worden uitgevoerd zoals beschreven voor elke bepaling, om er zeker van te zijn dat de cellijn gedurende meerdere passages stabiel blijft, vrij blijft van mycoplasma (d.w.z. vrij van bacteriële besmetting) en in de loop van de tijd haar vermogen behoudt om de verwachte ER-gemedieerde responsen te geven. De cellijnen moeten bovendien worden gecontroleerd op de juiste identiteit en op andere verontreinigingen (bv. schimmels, gisten en virussen).

Aantoning van de bekwaamheid van laboratoria

14. Alvorens onbekende chemische stoffen te testen met een van de bepalingen die onder deze testmethode vallen, moet elk laboratorium zijn bekwaamheid in het gebruik van de bepaling aantonen. Om zijn bekwaamheid aan te tonen moet elk laboratorium voor de agonismebepaling de 14 stoffen voor bekwaamheidstoetsing testen die zijn opgesomd in tabel 3, en voor de antagonismebepaling de 10 stoffen voor bekwaamheidstoetsing die zijn opgesomd in tabel 4. Deze bekwaamheidstoetsing dient eveneens ter bevestiging van het responsvermogen van het testsysteem. De lijst van stoffen voor bekwaamheidstoetsing is een subset van de referentiestoffen die worden aangegeven in de prestatienormen voor de ER TA-bepalingen (6). Deze stoffen zijn in de handel verkrijgbaar, vertegenwoordigen chemische klassen waarbij doorgaans sprake is van ER-agonistische of antagonistische activiteit, vertonen een geschikt potentiebereik voor de verwachte potentie van de ER-(ant)agonisten (d.w.z. sterk tot zwak) en voorzien ook in negatieve responsen. De stoffen voor bekwaamheidstoetsing moeten ten minste tweemaal, op verschillende dagen getest worden. De bekwaamheid wordt aangetoond door een correcte indeling (positief/negatief)

van elke stof. De bekwaamheidstoetsing moet worden herhaald door elke onderzoeker die de bepalingen leert. Afhankelijk van het celtype kunnen sommige van deze stoffen zich als SERM's gedragen en zowel agonistische als antagonistische activiteit vertonen. In de tabellen 3 en 4 worden de stoffen voor bekwaamheidstoetsing echter ingedeeld op basis van de activiteit waarvan bekend is dat deze het sterkst is, en dat is de activiteit die moet worden gebruikt om de bekwaamheid te beoordelen.

15. Als bewijs van de prestaties en ten behoeve van de kwaliteitscontrole moet elk laboratorium historische databanken van agonisten en antagonisten bijhouden met gegevens over de referentiestandaarden (bv. 17β-oestradiol en tamoxifen), de positieve en negatieve controlestoffen en de oplosmiddelcontrole (bv. DMSO). Aanvankelijk moet de databank gegenereerd worden op basis van ten minste 10 onafhankelijke testruns voor agonisten (bv. 17β-oestradiol) en 10 voor antagonisten (bv. tamoxifen). De resultaten van latere analyses van deze referentiestandaarden en oplosmiddelcontroles moeten worden toegevoegd om de databank uit te breiden en de consistentie en prestaties van de bioassay door het laboratorium in de loop van de tijd te waarborgen.

Tabel 3: Lijst van (14) stoffen voor bekwaamheidstoetsing voor agonismebepaling[8]

Nr.[7]	Stof	CAS RN	Verwachte respons[1]	STTA-bepaling			VM7Luc-ER TA-bepaling		Chemische klasse volgens de MeSH[5]	Productcategorie[6]
				PC_{10}-waarde (M)[2]	PC_{50}-waarde (M)[2]	Testconcentratiebereik (M)	EC_{50}-waarde VM7Luc (M)[3]	Hoogste conc. voor bereikbepaling (M)[4]		
14	Diëthylstilboestrol	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} – 10^{-8}$	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Koolwaterstof (cyclisch)	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
12	17α-oestradiol	57-91-0	POS	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Steroïde	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
15	*meso*-Hexestrol	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Koolwaterstof (cyclisch), fenol	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
11	4-*tert*-Octylfenol	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Fenol	Chemisch tussenproduct
9	Genisteïne	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Flavonoïde, heterocyclische verbinding	Natuurlijk product, geneesmiddel
6	Bisfenol A	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Fenol	Chemisch tussenproduct
2	Kaempferol	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Flavonoïde, heterocyclische verbinding	Natuurlijk product
3	Butylbenzylftalaat	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Carbonzuur, ester, ftaalzuur	Weekmaker, industriële chemische stof
4	*p,p'*-Methoxychloor	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	-	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Koolwaterstof (gehalogeneerd)	Pesticide, diergeneesmiddel
1	Ethylparabeen	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	-	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Carbonzuur, fenol	Geneesmiddel, conserveringsmiddel
17	Atrazine	1912-24-9	NEG	-	-	$10^{-10} – 10^{-4}$	-	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Heterocyclische verbinding	Herbicide
20	Spironolacton	52-01-7	NEG	-	-	$10^{-11} – 10^{-5}$	-	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Lacton, steroïde	Geneesmiddel
21	Ketoconazool	65277-42-1	NEG	-	-	$10^{-11} – 10^{-5}$	-	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Heterocyclische verbinding	Geneesmiddel
22	Reserpine	50-55-5	NEG	-	-	$10^{-11} – 10^{-5}$	-	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Heterocyclische verbinding, indool	Geneesmiddel, diergeneesmiddel

Afkortingen: CAS RN = registratienummer van de Chemical Abstract Service; EC_{50} = effectieve-concentratiemediaan van de teststof; NEG = negatief; POS = positief; PC_{10} (en PC_{50}) = de concentratie van een teststof waarbij de respons gelijk is aan 10 % (of 50 % voor de PC_{50}) van de respons die wordt opgewekt door de positieve controle (E2, 1 nM) op elke

plaat.

[1]De stoffen zijn als positief of negatief ingedeeld voor ER-agonistische activiteit op basis van de Background Review Documents (BRD) van het ICCVAM over bepalingen voor ER-binding en TA (31) en empirische gegevens en andere informatie uit geraadpleegde onderzoeken die na deze BRD's zijn gepubliceerd en gereviewd (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

[2]Waarden zoals gerapporteerd in het document "Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line" (30).

[3]De gemiddelde EC_{50}-waarden werden berekend aan de hand van de waarden zijn gerapporteerd door de laboratoria die betrokken waren bij de valideringsstudie voor de VM7Luc-ER TA-bepaling (XDS, CEVMA en Hiyoshi) (3).

[4]De vermelde concentraties waren de hoogste concentraties die getest werden (bereikbepaling) bij de validering van de VM7Luc-ER TA-bepaling. Wanneer laboratoria verschillende concentraties gebruikten, wordt de hoogste concentratie vermeld. Zie tabel 4-10 van het document "ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell®ER (VM7Luc-ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals" (3).

[5]De stoffen werden ingedeeld in een of meer chemische klassen aan de hand van de Medical Subject Headings (MeSH) van de Amerikaanse National Library of Medicine, een internationaal erkend gestandaardiseerd classificatiesysteem (beschikbaar op: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

[6]De stoffen werden ingedeeld in een of meer productcategorieën aan de hand van de Hazardous Substances Data Bank van de Amerikaanse National Library of Medicine (beschikbaar op: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

[7]Op basis van tabel 1 (List of Reference Chemicals (22) for Evaluation of ER Agonist Accuracy) van de prestatienormen (6).

[8]Als een stof voor bekwaamheidstoetsing niet meer in de handel verkrijgbaar is, mag een stof met dezelfde indeling en een vergelijkbare potentie, werking en chemische klasse worden gebruikt.

Tabel 4: Lijst van (10) stoffen voor bekwaamheidstoetsing voor antagonismebepaling

	Stof[a]	CAS RN	ER STTA-bepaling[1]			VM7Luc-ER TA-bepaling[2]			Verwachte effecten ER STTA[1]	Consensuele indeling door het ICCVAM[5]	Chemische klasse volgens de MeSH[6]	Productcategorie[7]
			ER TA-activiteit	IC_{50} (M)	Testconcentratiebereik (M)	ER TA-activiteit	IC_{50}[3] (M)	Hoogste conc. voor bereikbepaling (M)[4]				
1	4-Hydroxytamoxifen	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	matig POS	POS	Koolwaterstof (cyclisch)	Geneesmiddel
2	Raloxifeen HCl	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	matig POS	POS	Koolwaterstof (cyclisch)	Geneesmiddel
3	Tamoxifen	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} – 10^{-5}$	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	$2{,}69 \times 10^{-4}$	POS	POS	Koolwaterstof (cyclisch)	Geneesmiddel
4	17β-Oestradiol	50-28-2	NEG	-	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	-	$3{,}67 \times 10^{-3}$	naar verwachting NEG*	PN	Steroïde	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
5	Apigenine	520-36-5	NEG	-	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	-	$3{,}70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heterocyclische verbinding	Kleurstof, natuurlijk product, farmaceutisch tussenproduct
6	Di-*n*-butylftalaat	84-74-2	NEG	-	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEG	-	$3{,}59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Ester, ftaalzuur	Cosmetisch bestanddeel, industriële chemische stof, weekmaker
7	Flavon	525-82-6	NEG	-	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEG	-	$4{,}50 \times 10^{-4}$	naar verwachting NEG*	PN	Flavonoïde, heterocyclische verbinding	Natuurlijk product, geneesmiddel
8	Genisteïne	446-72-0	NEG	-	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	-	$3{,}70 \times 10^{-4}$	naar verwachting NEG*	NEG	Flavonoïde, heterocyclische verbinding	Natuurlijk product, geneesmiddel
9	*p*-*n*-Nonylfenol	104-40-5	NEG	-	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	-	$4{,}54 \times 10^{-4}$	niet getest	NEG	Fenol	Chemisch tussenproduct
10	Resveratrol	501-36-0	NEG	-	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEG	-	$4{,}38 \times 10^{-4}$	naar verwachting NEG*	NEG	Koolwaterstof (cyclisch)	Natuurlijk product

Afkortingen: CAS RN = registratienummer van de Chemical Abstract Service; M = molair; IC_{50} = concentratie van de teststof die 50 % remming veroorzaakt NEG = negatief; PN = beschouwd als negatief; POS = positief;

* ingedeeld als negatief op basis van literatuurstudie (2).

[a]Gangbare stoffen die op basis van de STTA-bepaling en de VM7Luc-ER TA-bepaling zijn aangewezen als ER-antagonisten of negatief en die in de valideringsstudie voor de VM7Luc-ER TA-bepaling zijn gebruikt ter beoordeling van de nauwkeurigheid (2) (3).

[1]Waarden zoals gerapporteerd in het "Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2)".

[2]ICCVAM-evaluatieverslag "ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc-ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3)".

[3]De gemiddelde EC_{50}-waarden werden berekend aan de hand van de waarden zijn gerapporteerd door de laboratoria die betrokken waren bij de valideringsstudie voor de VM7Luc-ER TA-bepaling (XDS, CEVMA en Hiyoshi) (3).

[4]De vermelde concentraties waren de hoogste concentraties die getest werden (bereikbepaling) bij de validering van de VM7Luc-ER TA-bepaling. Wanneer laboratoria verschillende concentraties gebruikten, wordt de hoogste concentratie vermeld. Zie tabel 4-11 van het document "ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell®ER (VM7Luc-ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals" (3).

[5]De stoffen zijn als ER-antagonist of negatief ingedeeld op basis van gegevens uit de Background Review Documents (BRD) van het ICCVAM over testmethoden voor ER-binding en TA (31) en gegevens uit publicaties die na deze BRD's zijn gepubliceerd en gereviewd (2) (3) (18) (31).

[6]De stoffen werden ingedeeld in een of meer chemische klassen aan de hand van de Medical Subject Headings (MeSH) van de Amerikaanse National Library of Medicine, een internationaal erkend gestandaardiseerd classificatiesysteem (beschikbaar op http://www.nlm.nih.gov/mesh).

[7]De stoffen werden ingedeeld in een of meer productcategorieën aan de hand van de Hazardous Substances Data Bank van de Amerikaanse National Library of Medicine (beschikbaar op http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

Aanvaardbaarheidscriteria voor de testrun

16. Of een testrun aanvaard of verworpen wordt, hangt af van de beoordeling van de resultaten voor de referentiestandaarden en de controles die voor elk experiment worden gebruikt. De waarden voor de PC_{50} (EC_{50}) of IC_{50} voor de referentiestandaarden moeten voldoen aan de aanvaardbaarheidscriteria voor de gekozen bepaling (voor de STTA-bepaling zie aanhangsel 2, voor de VM7Luc-ER TA-bepaling zie aanhangsel 3) en alle positieve/negatieve controles moeten voor elk aanvaard experiment correct zijn ingedeeld. Het laboratorium moet aantonen de bepaling consistent te kunnen uitvoeren door een historische databank van de referentiestandaarden en controles op te zetten en bij te houden (zie punt 15). Als maatstaf voor de intralaboratoriumreproduceerbaarheid kunnen de standaarddeviaties (SD) of variatiecoëfficiënten (CV) van de gemiddelden van de curve-fittingsparameters voor de referentiestandaarden van meerdere experimenten worden gebruikt. Bovendien moet aan de volgende beginselen in verband met de aanvaardbaarheidscriteria worden voldaan:

- er moeten voldoende gegevens zijn voor een kwantitatieve beoordeling van de ER-activering (voor een agonismebepaling) of ER-remming (voor een antagonismebepaling) (d.w.z. effectiviteit en potentie);
- om zeker te zijn van voldoende gevoeligheid moet de gemiddelde reporteractiviteit voor de referentieconcentratie van het referentieoestrogeen hoger zijn dan of gelijk aan de minimale activiteit zoals gespecificeerd in de testmethodes in verhouding tot de activiteit van de vehiculumcontrole (oplosmiddelcontrole). Voor de STTA-bepaling en de VM7Luc-ER TA-bepaling betekent dit viermaal zo hoog als de gemiddelde activiteit van de vehiculumcontrole voor elke plaat;
- de geteste controles moeten binnen het oplosbaarheidsbereik van de teststoffen blijven en mogen geen cytotoxiciteit vertonen.

Analyse van de gegevens

17. Om te bepalen of een respons positief of negatief is, moet de voor elke bepaling vastgestelde procedure voor gegevensinterpretatie worden gebruikt.

18. Als aan de aanvaardbaarheidscriteria (punt 16) wordt voldaan, betekent dit weliswaar dat de bepaling naar behoren functioneert, maar wil dit nog niet zeggen dat een bepaalde testrun kloppende gegevens produceert. Het reproduceren van de resultaten van de eerste testrun is de beste indicatie dat de geproduceerde gegevens kloppen. Als twee testruns reproduceerbare gegevens opleveren (bv. de resultaten van beide testruns wijzen uit dat een teststof positief is), is het niet nodig om een derde testrun uit te voeren.

19. Als twee testruns geen reproduceerbare resultaten opleveren (bv. een teststof is positief in de ene en negatief in de andere testrun), of als er meer zekerheid nodig is over de uitkomst van

deze bepaling, moeten ten minste drie onafhankelijke testruns worden uitgevoerd. In dat geval wordt de indeling gebaseerd op de twee van de drie resultaten die overeenkomen.

Algemene criteria voor gegevensinterpretatie

20. Er is op vooralsnog geen algemeen erkende methode voor het interpreteren van ER TA-gegevens, maar kwalitatieve (bv. positieve/negatieve) en/of kwantitatieve (bv. EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}) beoordelingen van ER-gemedieerde activiteit moeten wel stoelen op empirische gegevens en wetenschappelijk verantwoorde afwegingen. Waar mogelijk moeten positieve resultaten worden gespecificeerd met zowel de grootte van het effect in vergelijking met de vehiculumcontrole (oplosmiddelcontrole) of het referentie-oestrogeen, als de concentratie waarbij het effect optreedt (bv. een EC_{50}, PC_{50}, RPC_{Max}, IC_{50} enz.).

Testverslag

21. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Bepaling:

- de gebruikte bepaling.
- *Controle/referentiestandaard/teststof:*
- bron, partijnummer, uiterste gebruiksdatum, indien beschikbaar;
- stabiliteit van de teststof, indien bekend;
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel, indien bekend;
- meting van pH, osmolaliteit en neerslag in het kweekmedium waaraan de teststof werd toegevoegd, indien van toepassing.

Stof die uit één component bestaat:

- fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water en aanvullende relevante fysisch-chemische eigenschappen;
- chemische identificatiegegevens, zoals IUPAC- of CAS-naam, CAS-nummer, SMILES- of InChI-code, structuurformule, zuiverheid, chemische identiteit van onzuiverheden, indien van toepassing en praktisch haalbaar enz.

Stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB's en mengsels:

- voor zover mogelijk, karakterisering aan de hand van chemische identiteit (zie hierboven), kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen van de bestanddelen.

Oplosmiddel/vehiculum:

- karakterisering (aard, leverancier en partij);

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

Cellen:

- type en bron van de cellen:
    - is er endogene expressie van de ER? Zo niet, welke reporter(s) werd(en) er getransfecteerd?
    - het/de gebruikte reporterconstruct(en) (waaronder brondiersoort(en));
    - transfectiemethode;
    - selectiemethode voor het handhaven van stabiele transfectie (indien van toepassing);
    - is de transfectiemethode relevant voor stabiele cellijnen?
- aantal passages (na ontdooiing);
- aantal passages van cellen bij ontdooiing;
- methoden om de celculturen in leven te houden.

Testomstandigheden:

- beperkte oplosbaarheid;
- beschrijving van de methoden die zijn toegepast voor de beoordeling van de levensvatbaarheid;
- mediumsamenstelling, CO_2-concentratie;
- concentraties van de teststof;
- toegevoegd volume vehiculum en teststof;
- incubatietemperatuur en vochtigheidsgraad;
- duur van de behandeling;
- celdichtheid bij aanvang van en tijdens de behandeling;
- positieve en negatieve referentiestandaarden;
- reporterreagentia (productnaam, leverancier en partij);
- criteria om te bepalen of het resultaat van een testrun positief, negatief of onduidelijk is.

Aanvaardbaarheidscontrole:

- x-voudige inducties voor elke testplaat en of deze aan het minimum voldoen dat op basis van de historische controles voor de bepaling vereist is;

- daadwerkelijke waarden voor de aanvaardbaarheidscriteria, bv. $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log_{10}IC_{50}$ en Hill-coëfficiënten, voor de gelijktijdige positieve controles/referentiestandaarden.

Resultaten:

- ruwe en genormaliseerde gegevens;
- het maximale x-voudige-inductieniveau;
- cytotoxiciteitsgegevens;
- in voorkomend geval, de laagste effectieve concentratie (LEC);
- RPC_{Max}, PC_{Max}, PC_{50}, IC_{50} en/of $EC_{50,}$ voor zover van toepassing;
- indien mogelijk het verband tussen concentratie en respons;
- statistische analyses, indien uitgevoerd, samen met een maat voor de fout en de betrouwbaarheid (bv. SEM, SD, CV of 95 %-BI) en een beschrijving hoe deze waarden zijn verkregen.

Bespreking van de resultaten

Conclusie

LITERATUUR

(1) OESO (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(2) OESO (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vit*ro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(4) Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer. Res., 58(23): p. 5367-73.

(5) Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research, 13(1): p. 67-82.

(6) OESO (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(7) OESO (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(8) OESO (2012). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: p. 20- 6.

(10) Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer, 16(4): p. 1073-89.

(11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): p. 63- 6.

(12) Jefferson W.N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, Journal of Chromatography B, 777(1-2): p. 179-189.

(13) Sonneveld E. *et al.* (2006). Comparison of I*n Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol*. Sci., 89(1): p. 173-187.

(14) Takeyoshi M. *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, Toxicology Letters, 126(2): p. 91- 98.

(15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, ATLA Alternatives to Laboratory Animals,28(1): p. 81-118.

(16) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol,71(10): p. 1459-69.

(17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol*. Lett, 102-103, 677-680.

(18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.

(19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor β - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, Journal of Endocrinology, 163(3): p. 379-383.

(21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor β (hERβ) and its Heterodimerization with ER□□ *In Vivo* and *In Vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): p. 122-126.

(22) Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor β-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,82(12): p. 4258-4265.

(23) Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): p. 204-211.

(24) Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): p. 105-12.

(25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-β: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): p. 1703-1714.

(26) Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): p. 558-568.

(27) Anderson J.N. Clark J.H. and Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): p. 1460-1468.

(28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): p. 515-522.

(29) Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: p. 45-80.

(30) Jensen E.V. *et al.* (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3):p. 547-569.

(31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505.).

(32) Kanno J. *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 109:785-94.

(33) Kanno J. *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530-1549.

(34) Kanno J. *et al.* (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.

(35) Geisinger *et al.* (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(36) Baldwin *et al.* (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(37) Li, Y. *et al.* (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(38) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

Aanhangsel 1

DEFINITIES EN AFKORTINGEN

Aanvaardbaarheidscriteria: minimumnormen voor de prestaties van experimentele controles en referentiestandaarden. Wil een experiment geldig zijn, dan moet aan alle aanvaardbaarheidscriteria worden voldaan.

Agonist: een stof die bij binding aan een specifieke receptor een respons, bv. transcriptie, opwekt.

Antagonist: een type receptorligand of chemische stof die zelf geen biologische respons teweegbrengt bij binding aan een receptor, maar die agonist-gemedieerde responsen blokkeert of dempt.

Anti-oestrogene activiteit: het vermogen van een chemische stof om de werking van 17β-oestradiol te onderdrukken, gemedieerd door oestrogeenreceptoren.

Behandeling met met dextraan beklede houtskool: behandeling van serum voor celkweek. Door te behandelen met met dextraan beklede kool (vaak "strippen" genoemd) worden endogene hormonen en hormoon-bindende eiwitten verwijderd.

Bekwaamheid: het bewezen vermogen om een bepaling naar behoren uit te voeren alvorens over te gaan tot het testen van onbekende stoffen.

Bepaling: in het kader van deze testmethode is een bepaling een van de methoden die als valide zijn aanvaard omdat ze aan de beschreven prestatiecriteria voldoen. Onderdelen van een bepaling zijn bijvoorbeeld onder meer: de specifieke cellijn met bijbehorende groeiomstandigheden, specifieke media waarin de test wordt uitgevoerd, opzet van de kweekplaten, ordening en verdunningen van de teststoffen, en eventuele andere vereiste kwaliteitscontrolemaatregelen en bijbehorende stappen ter evaluatie van de gegevens.

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een bepaling, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden uitgevoerd. De betrouwbaarheid wordt bepaald door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid.

Celmorfologie: de vorm en het uiterlijk van cellen die in een monolaag in één putje van een weefselkweekplaat worden gekweekt. Stervende cellen vertonen vaak een afwijkende celmorfologie.

Chemische stof: een stof of een mengsel.

Conceptueel kader: het conceptueel kader van de OESO voor het testen en beoordelen van hormoonontregelende stoffen.

Cytotoxiciteit: schadelijke effecten op de celstructuur of celfunctie die uiteindelijk tot celdood

kunnen leiden en die kunnen blijken uit een afname van het aantal cellen dat aan het einde van de blootstellingsperiode in het putje aanwezig is, of een afname in sterkte van een maat voor de celfunctie in vergelijking met de gelijktijdige vehiculumcontrole.

CV: variatiecoëfficiënt

DCC-FBS: met met dextraan beklede kool behandeld foetaal runderserum.

DMEM: Dulbecco's Modification of Eagle's Medium

DMSO: dimethylsulfoxide

E2: 17β-oestradiol

EC_{50}: de effectieve-concentratiemediaan van een teststof.

EFM: oestrogeen-vrij medium. DMEM aangevuld met 4,5 % DCC-FBS, 1,9 % L-glutamine en 0,9 % Pen-Strep.

ER: oestrogeenreceptor.

ERE: oestrogeenresponselement.

ER TA: transactivatie van de oestrogeenreceptor.

FBS: foetaal runderserum.

Gevalideerde testmethode: een bepaling waarvoor valideringsstudies zijn gedaan om de relevantie (inclusief nauwkeurigheid) en betrouwbaarheid voor een bepaald doel te bepalen. Er moet worden opgemerkt dat een gevalideerde testmethode niet per definitie voldoende nauwkeurig en betrouwbaar is om aanvaardbaar te worden bevonden voor het voorgestelde doel (1).

Gevoeligheid: het percentage van alle positieve/actieve stoffen dat door middel van de bepaling correct wordt ingedeeld. Het is een maat voor de nauwkeurigheid van een bepaling die categoriale resultaten oplevert en is een belangrijke factor voor de beoordeling van de relevantie van een bepaling (1).

HeLa: een onsterfelijke humane baarmoederhalskankercellijn.

HeLa9903: een subkloon van HeLa waarbij hERα en een luciferasereportergen stabiel getransfecteerd zijn.

hERα: humane oestrogeenreceptor-alfa

hERβ: humane oestrogeenreceptor-beta

Hormoonontregeling: de verstoring van de synthese, de opslag en het metabolisme van

hormonen

IC_{50}: de effectieve-concentratiemediaan van een remmende teststof.

ICCVAM: het Amerikaanse Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods.

Interlaboratoriumreproduceerbaarheid: een maatstaf voor de mate waarin verschillende gekwalificeerde laboratoria die gebruikmaken van hetzelfde protocol en die dezelfde stoffen testen, in kwalitatief en kwantitatief opzicht vergelijkbare resultaten kunnen produceren. De interlaboratoriumreproduceerbaarheid wordt bepaald tijdens de prevaliderings- en valideringsprocessen en geeft aan in hoeverre een bepaling met succes tussen laboratoria kan worden overgedragen; dit wordt ook wel reproduceerbaarheid tussen laboratoria genoemd (1).

Intralaboratoriumreproduceerbaarheid: een bepaling van de mate waarin gekwalificeerde mensen binnen hetzelfde laboratorium met succes resultaten kunnen repliceren met gebruikmaking van een specifiek protocol op verschillende tijdstippen. Dit wordt ook "reproduceerbaarheid binnen laboratoria" genoemd (1).

LEC: de laagste effectieve concentratie is de laagste concentratie van de teststof die een respons opwekt (d.w.z. de laagste concentratie van de teststof waarbij de x-voudige inductie statistisch verschilt van de gelijktijdige vehiculumcontrole).

"Me too"-test: een informele uitdrukking voor een bepaling die in structureel en functioneel opzicht vergelijkbaar is met een gevalideerde en geaccepteerde testmethode. Dit is een alternatieve benaming voor gelijksoortige testmethode.

MMTV: muizen-borstkankervirus.

MT: metallothioneïne.

Nauwkeurigheid (concordantie): de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de bepaling en erkende referentiewaarden. Het is een maat voor de prestaties van de bepaling en één aspect van relevantie. Deze term en de term "concordantie", waaronder het percentage correcte uitkomsten van een bepaling wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt (1).

Oestrogene activiteit: het vermogen van een chemische stof om 17β-oestradiol te imiteren door te kunnen binden aan oestrogeenreceptoren en deze te kunnen activeren. Met deze testmethode kan hERα-gemedieerde oestrogene activiteit worden gedetecteerd.

OHT: 4-hydroxytamoxifen.

Onafhankelijke testruns: aparte, onafhankelijke experimenten waarin het chemische effect op het biologische resultaat van de bepaling wordt beoordeeld met behulp van cellen uit verschillende pools, met vers verdunde chemische stoffen en uitgevoerd op verschillende dagen door verschillende medewerkers.

Onderzoek: al het experimentele werk dat wordt uitgevoerd voor het beoordelen van één specifieke stof met behulp van een specifieke bepaling. Een onderzoek omvat alle stappen waaronder tests voor de oplosbaarheid van de teststof in het testmedium, voorbereidende bereikbepalingstestruns, alle nodige volledige testruns, gegevensanalyses, kwaliteitsborging, cytotoxiciteitsbeoordelingen enz. Als het onderzoek is afgerond kan het effect van de teststof op het toxiciteitsdoelwit dat met de gebruikte bepaling wordt beoordeeld, worden ingedeeld (d.w.z. actief, niet-actief of geen uitsluitsel) en kan een schatting worden gemaakt van de potentie ten opzichte van de positieve referentiestof.

PBTG: op prestaties gebaseerde testrichtlijn.

PC_{10}: de concentratie van een teststof waarbij de gemeten activiteit in een agonismebepaling 10 % is van de maximale activiteit die wordt opgewekt door de positieve controle (E2 bij 1 nM voor de STTA-bepaling) op elke plaat.

PC_{50}: de concentratie van een teststof waarbij de gemeten activiteit in een agonismebepaling 50 % is van de maximale activiteit die wordt opgewekt door de positieve controle (E2 bij de in de testmethode gespecificeerde referentieconcentratie) op elke plaat.

PC_{Max}: de concentratie waarbij een teststof de RPC_{Max} opwekt.

Positieve controle: een sterk actieve stof, bij voorkeur 17β-oestradiol die in alle bepalingen wordt opgenomen om na te gaan of de bepaling naar behoren functioneert.

Prestatienormen: normen, gebaseerd op een gevalideerde bepaling die de basis vormen voor de beoordeling van de vergelijkbaarheid van een voorgestelde, in mechanistisch en functioneel opzicht gelijksoortige bepaling. Dit zijn 1) essentiële componenten van de bepaling; 2) een minimumlijst van referentiestoffen die zijn gekozen uit de stoffen die zijn gebruikt om de aanvaardbare prestaties van de gevalideerde testmethode aan te tonen; en 3) de vergelijkbare nauwkeurigheids- en betrouwbaarheidsniveaus die door de voorgestelde bepaling moeten worden gehaald wanneer ze worden beoordeeld aan de hand van de minimumlijst van referentiestoffen; deze waarden zijn gebaseerd op de waarden die voor de gevalideerde testmethode zijn verkregen (1).

Referentie-oestrogeen (Positieve controle): 17β-oestradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referentiestandaard: een referentiestof die wordt gebruikt om de geschiktheid van een bepaling aan te tonen. De referentiestof voor de STTA-bepaling en de VM7Luc-ER TA-bepaling is 17β-oestradiol.

Referentietestmethoden: de bepalingen waarop PBTG 455 gebaseerd is.

Relevantie: beschrijving van het verband van een bepaling met het te onderzoeken effect en of de bepaling betekenis heeft en nuttig is voor een bepaald doel. Het is de mate waarin de bepaling het te onderzoeken biologische effect correct meet of voorspelt. Relevantie omvat een beoordeling van de nauwkeurigheid (concordantie) van een bepaling (1).

RLU: relatieve lichteenheden.

RNA: ribonucleïnezuur.

RPC_{Max}: maximale respons die door een teststof wordt opgewekt, uitgedrukt als percentage van de respons die wordt opgewekt door 1 nM E2 op dezelfde plaat.

RPMI: RPMI 1640-medium, aangevuld met 0,9 % Pen-Strep en 8,0 % FBS.

SD: standaarddeviatie.

Specificiteit: het percentage van alle negatieve/niet-actieve stoffen dat door middel van de test correct wordt ingedeeld. Het is een maat voor de nauwkeurigheid van een bepaling die categoriale resultaten oplevert en is een belangrijke factor voor de beoordeling van de relevantie van een bepaling (1).

Stabiele transfectie: wanneer DNA zodanig in gekweekte cellen getransfecteerd wordt dat het stabiel geïntegreerd wordt in het celgenoom, met als resultaat de stabiele expressie van de getransfecteerde genen. Klonen van stabiel getransfecteerde cellen worden geselecteerd aan de hand van stabiele markers (bv. resistentie tegen G418).

Stof: in het kader van REACH[12] wordt een stof gedefinieerd als een chemisch element en de verbindingen ervan, zoals zij voorkomen in natuurlijke toestand of bij de vervaardiging ontstaan, met inbegrip van alle additieven die nodig zijn voor het behoud van de stabiliteit ervan en alle onzuiverheden ten gevolge van het toegepaste procedé, doch met uitzondering van elk oplosmiddel dat kan worden afgescheiden zonder aantasting van de stabiliteit van de stof of wijziging van de samenstelling ervan. In het kader van het VN-GHS wordt een sterk vergelijkbare definitie gehanteerd (1).

Stoffen voor bekwaamheidstoetsing: een subset van de referentiestoffen die in de prestatienormen zijn opgenomen. Laboratoria kunnen deze stoffen gebruiken om hun technische bekwaamheid met de gestandaardiseerde testmethode aan te tonen. Doorgaans zijn de selectiecriteria voor deze stoffen onder meer dat ze het hele spectrum van responsen bestrijken, dat ze in de handel verkrijgbaar zijn en dat er kwalitatief hoogwaardige referentiegegevens beschikbaar zijn.

---

[12] Verordening (EG) nr. 1907/2006 van het Europees Parlement en de Raad van 18 december 2006 inzake de registratie en beoordeling van en de autorisatie en beperkingen ten aanzien van chemische stoffen (REACH), tot oprichting van een Europees Agentschap voor chemische stoffen, houdende wijziging van Richtlijn 1999/45/EG en houdende intrekking van Verordening (EEG) nr. 793/93 van de Raad en Verordening (EG) nr. 1488/94 van de Commissie alsmede Richtlijn 76/769/EEG van de Raad en de Richtlijnen 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG en 2000/21/EG van de Commissie (PB L 304 van 22.11.2007, blz. 1).

STTA-bepaling: Stably Transfected Transactivation Assay, bepaling op basis van de transcriptionele activatie van ERα waarbij gebruikgemaakt wordt van de cellijn HeLa 9903.

TA (Transactivatie): de initiëring van mRNA-synthese als respons op een specifiek chemisch signaal, zoals de binding van een oestrogeen aan de ER.

Testrun: een afzonderlijk experiment waarbij het effect van een chemische stof op het biologische resultaat van de bepaling wordt beoordeeld. Elke testrun is een compleet experiment dat wordt uitgevoerd op cellen die vanuit één pool in duploputjes zijn uitgeplaat.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

Transcriptie: mRNA synthese.

UVCB: chemische stoffen waarvan de samenstelling niet bekend of variabel is, complexe reactieproducten of biologische materialen.

Validering: het proces om de betrouwbaarheid en de relevantie van een bepaald(e) benadering, methode, bepaling, proces of beoordeling voor een bepaald doel vast te stellen (1).

VC (vehiculumcontrole: het oplosmiddel dat wordt gebruikt voor het oplossen van de test- en controlestoffen wordt afzonderlijk als vehiculum zonder opgeloste chemische stof getest.

VM7: een geïmmortaliseerde adenocarcinoomcel die endogeen ER tot expressie brengt.

VM7Luc4E2: de cellijn VM7Luc4E2 is afgeleid van de geïmmortaliseerde, uit mensen verkregen adenocarcinoomcellen VM7 die endogeen de beide vormen van de oestrogeenreceptor (ERα en ERβ) tot expressie brengen, en die stabiel getransfecteerd zijn met het plasmide pGudLuc7.ERE. Dit plasmide bevat vier kopieën van een synthetisch oligonucleotide dat het oestrogeenresponselement stroomopwaarts van de promotor van het muizen-borstkankervirus (MMTV) en het vuurvlieg-luciferasegen bevat.

Zwakke positieve controle: een zwak actieve stof, geselecteerd vanuit de lijst met referentiestoffen, die in alle bepalingen wordt opgenomen om na te gaan of de bepaling naar behoren functioneert.

Aanhangsel 2

TRANSACTIVATIEBEPALING OP BASIS VAN STABIEL GETRANSFECTEERDE HUMANE OESTROGEENRECEPTOR-A VOOR HET OPSPOREN VAN OESTROGEENAGONISTISCHE EN -ANTAGONISTISCHE ACTIVITEIT VAN CHEMISCHE STOFFEN, WAARBIJ GEBRUIKGEMAAKT WORDT VAN DE CELLIJN HERA-HELA-9903

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN (ZIE OOK ALGEMENE INLEIDING)

1. Voor deze transactivatiebepaling (TA-bepaling) wordt gebruikgemaakt van de cellijn hERα-HeLa-9903 voor het opsporen van oestrogeenagonistische activiteit gemedieerd door de humane oestrogeenreceptor-alfa (hERα). In de valideringsstudie voor de bepaling op basis van stabiele transfectie en transactivatie (STTA) door het Japanse Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI), met gebruikmaking van de cellijn hERα-HeLa-9903 voor het opsporen van oestrogeenagonistische en -antagonistische activiteit gemedieerd door de humane oestrogeenreceptor-alfa (hERα), werden de relevantie en betrouwbaarheid van de bepaling voor het beoogde doel aangetoond (1).

2. Deze bepaling is speciaal ontworpen voor het opsporen van hERα-gemedieerde TA door meting van chemiluminescentie als eindpunt. Er zijn echter niet-receptor-gemedieerde luminescentiesignalen gemeld bij fyto-oestrogeenconcentraties hoger dan 1 μM als gevolg van overactiviteit van het luciferasereportergen (2) (3). Hoewel de dosis-responscurve aangeeft dat er bij lagere concentraties daadwerkelijk activatie van het ER-systeem optreedt, moet de luciferase-expressie bij hoge concentraties fyto-oestrogenen of soortgelijke verbindingen waarvan vermoed wordt dat zij fyto-oestrogeenachtige overactivatie van het luciferasereportergen kunnen veroorzaken, in ER STTA-bepalingssystemen zorgvuldig worden bestudeerd (aanhangsel 1).

3. Alvorens deze bepaling te gebruiken met het oog op regelgeving, moeten de punten onder "ALGEMENE INLEIDING" en "COMPONENTEN VAN DE ER TA-BEPALING" worden geraadpleegd. De in deze TG gebruikte definities en afkortingen staan in aanhangsel 2.1.

PRINCIPE VAN DE BEPALING (ZIE OOK DE ALGEMENE INLEIDING)

4. De bepaling wordt gebruikt om de binding van een ligand aan de ER te signaleren. Na de ligandbinding verplaatst het receptor-ligandcomplex zich naar de nucleus, waar het aan specifieke DNA-responselementen bindt en een vuurvlieg-luciferasereportergen transactiveert, wat leidt tot een verhoogde cellulaire expressie van het luciferase-enzym. Luciferine is een substraat dat door het enzym luciferase wordt omgezet in een bioluminescentieproduct dat kwantitatief gemeten kan worden met een luminometer. De luciferase-activiteit kan snel en goedkoop worden bepaald met behulp van een aantal in de handel verkrijgbare testkits.

5. Voor het testsysteem wordt gebruikgemaakt van de cellijn hERα-HeLa-9903, die is afgeleid van een humane baarmoederhalstumor met twee stabiel geïnsereerde constructen: i) het hERα -expressieconstruct (dat codeert voor de volledige humane receptor), en ii) een vuurvlieg-luciferasereporterconstruct met vijf tandemherhalingen van een oestrogeenresponselement (ERE) van vitellogenine, gestuurd door een promotor-TATA-element van muizen-metallothioneïne (MT). Er wordt doorgaans gebruikgemaakt van het muizen-MT-TATA-genconstruct omdat is aangetoond dat dit de beste prestaties levert. Zo kan deze hERα-HeLa-9903-cellijn het vermogen van een teststof meten om hERα-gemedieerde transactivatie van de expressie van het luciferasegen te induceren.

6. In het geval van een ER-agonismebepaling wordt de interpretatie van de gegevens gebaseerd op het criterium of het maximale responsniveau dat door een teststof wordt geïnduceerd, al dan niet gelijk is aan of hoger is dan een agonistische respons die overeenkomt met 10 % van de respons die wordt geïnduceerd door een concentratie die bij de positieve controle een maximale respons induceert, te weten 1 nM 17β-oestradiol (E2) (d.w.z. de PC_{10}). In het geval van een ER-antagonismebepaling wordt de interpretatie van de gegevens gebaseerd op het criterium of de respons al dan niet een afname van de activiteit met ten minste 30 % laat zien ten opzichte van de respons die wordt geïnduceerd door de spike-in-controle (25 pM van E2), zonder cytotoxiciteit. De analyse en de interpretatie van de gegevens worden uitvoerig besproken in de punten 34 tot en met 48.

PROCEDURE

Cellijnen

7. Voor de bepaling moet de stabiel getransfecteerde cellijn hERα-HeLa-9903 worden gebruikt. Deze cellijn kan worden verkregen bij de celbank Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB)[13] na ondertekening van een overeenkomst inzake overdracht van materiaal (MTA).

8. Voor het testen mogen alleen cellen worden gebruikt die zijn gekarakteriseerd als vrij van mycoplasma. Voor een gevoelige detectie van mycoplasma-infectie moet bij voorkeur de methode PT-PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) worden gebruikt (4) (5) (6).

Stabiliteit van de cellijn

[13] JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan, Fax: +81-72-641-9812

9. Om de stabiliteit van de cellijn te controleren moeten E2, 17α-oestradiol, 17α-methyltestosteron en corticosteron worden gebruikt als referentiestandaarden voor de agonismebepaling. Bovendien moet telkens als de bepaling wordt uitgevoerd ten minste eenmaal een volledige concentratie-responscurve worden gemeten in het in tabel 1 aangegeven testconcentratiebereik, waarbij de resultaten in overeenstemming moeten zijn met de resultaten in tabel 1.

10. In geval van een antagonismebepaling moeten er tegelijkertijd met elke testrun twee volledige concentratiecurven worden gemeten voor twee referentiestandaarden: tamoxifen en flutamide. Voor deze twee stoffen moet worden toegezien op een correcte kwalitatieve indeling als positief of negatief.

Omstandigheden voor het kweken en uitplaten van de cellen

11. De cellen moeten worden bewaard in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) zonder fenolrood, aangevuld met 60 mg/l van het antibioticum kanamycine en 10 % met met dextraan beklede kool behandeld foetaal runderserum (DCC-FBS) in een CO_2-incubator (5 % CO_2) bij 37 ± 1 ˚C. Zodra 75-90 % confluentie wordt bereikt, kunnen de cellen worden overgeënt in 10 ml $0{,}4 \times 10^5 - 1 \times 10^5$ cellen/ml in petrischaaltjes van 100 mm. De cellen moeten worden gesuspendeerd met 10 % FBS-EMEM (wat gelijk is aan EMEM met DCC-FBS) en vervolgens worden uitgeplaat in de putjes van een microtiterplaat in een dichtheid van 1×10^4 cellen/(100 µl × putje). Vervolgens moeten de cellen gedurende 3 uur worden gepre-incubeerd in een 5 % CO_2-incubator bij 37 ± 1 ˚C alvorens te worden blootgesteld aan de teststof. Het kunststof laboratoriumgerei moeten vrij zijn van oestrogene activiteit.

12. Om de integriteit van de respons te behouden moeten de cellen in meerdere passages uit de bevroren voorraad worden gekweekt in het geconditioneerde medium en mogen ze niet meer dan 40 passages worden gekweekt. Voor de cellijn hERα-HeLa-9903 betekent dit minder dan drie maanden. De prestaties van de cellen kunnen echter achteruitgaan wanneer ze onder ongeschikte kweekomstandigheden worden gekweekt.

13. Het DCC-FBS kan worden bereid zoals beschreven in aanhangsel 2.2 of in de handel worden verkregen.

Aanvaardbaarheidscriteria

Positieve en negatieve referentiestandaarden voor ER-agonismebepaling

14. Voorafgaand aan en gedurende het onderzoek moet het responsvermogen van het testsysteem worden gecontroleerd met behulp van geschikte concentraties van een sterk oestrogeen: E2, een zwak oestrogeen (17α-oestradiol), een zeer zwakke agonist (17α-methyltestosteron) en een negatieve stof (corticosteron). De aanvaardbare bereiken op basis van de valideringsstudie (1) staan in tabel 1. Deze vier gelijktijdige referentiestandaarden moeten in elk experiment worden opgenomen en de resultaten moeten binnen de gegeven grenzen van het aanvaardbare

bereik vallen. Is dit niet het geval, dan moet de oorzaak van het niet voldoen aan de aanvaardbaarheidscriteria worden bepaald (bv. hantering van de cellen en kwaliteit en concentratie van serum en antibiotica) en moet de bepaling worden herhaald. Wanneer aan de aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, is een consequent gebruik van de materialen voor celkweek van essentieel belang voor een minimale variabiliteit in de EC_{50}, PC_{50} en PC_{10}. De vier gelijktijdige referentiestandaarden, die in elk experiment moeten worden opgenomen (uitgevoerd onder dezelfde omstandigheden, waaronder materialen, aantal passages van de cellen en uitvoerenden), waarborgen de gevoeligheid van de bepaling, omdat de PC_{10}'s van de drie positieve referentiestandaarden binnen het aanvaardbare bereik moeten vallen, evenals de PC_{50}'s en EC_{50}'s, wanneer deze berekend kunnen worden (zie tabel 1).

Tabel 1: Aanvaardbare bereiken voor de vier referentiestandaarden voor de ER-agonismebepaling

Naam	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Hill-coëfficiënt	Testbereik
17β-Oestradiol (E2) CAS-nr.: 50-28-2	-11,4~-10,1	< -11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10^{-14}~10^{-8} M
17α-Oestradiol CAS-nr.: 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10^{-12}~10^{-6} M
Corticosteron CAS-nr.: 50-22-6	–	–	–	–	10^{-10}~10^{-4} M
17α-Methyltestosteron CAS-nr.: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	–	–	10^{-11}~10^{-5} M

Positieve en negatieve referentiestandaarden voor ER-antagonismebepaling

15. Voorafgaand aan en gedurende het onderzoek moet het responsvermogen van het testsysteem worden gecontroleerd met behulp van geschikte concentraties van een positieve stof (tamoxifen) en een negatieve stof (flutamide). De aanvaardbare bereiken op basis van de valideringsstudie (1) staan in tabel 2. Deze twee gelijktijdige referentiestandaarden moeten in elk experiment worden opgenomen en de resultaten moeten correct worden beoordeeld zoals aangegeven in de criteria. Is dit niet het geval, dan moet de oorzaak van het niet voldoen aan de criteria worden bepaald (bv. hantering van de cellen en kwaliteit en concentratie van serum en antibiotica) en moet de bepaling worden herhaald. Bovendien moeten de IC_{50}-waarden voor een positieve stof (tamoxifen) worden berekend en de resultaten moeten binnen de opgegeven aanvaardbare grenswaarden liggen. Wanneer aan de aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, is een consequent gebruik van de materialen voor celkweek van essentieel belang voor een minimale variabiliteit in de IC_{50}. De twee gelijktijdige referentiestandaarden, die moeten worden opgenomen in elk experiment (dat worden uitgevoerd onder dezelfde omstandigheden, waaronder materialen, aantal passages van de cellen en uitvoerenden), waarborgen de gevoeligheid van de bepaling (zie tabel 2).

Tabel 2: Criteria en aanvaardbare bereiken voor de twee referentiestandaarden voor de ER-antagonismebepaling

Naam	Criterium	LogIC$_{50}$	Testbereik
Tamoxifen CAS-nr.: 10540-29-1	positief: IC$_{50}$ moet worden berekend	-5,942~-7,596	10^{-10}～10^{-5} M
Flutamide CAS-nr.: 13311-84-7	negatief: IC$_{30}$ hoeft niet te worden berekend	-	10^{-10}～10^{-5} M

Positieve en vehiculumcontroles

16. De positieve controle voor de ER-agonismebepaling (1 nM E2) en de ER-antagonismebepaling (10 µM TAM) moet voor elke plaat ten minste in drievoud worden getest. Het te gebruiken vehiculum voor het oplossen van de teststof moet voor elke plaat ten minste in drievoud worden getest als vehiculumcontrole (VC). Als voor de positieve controle een ander vehiculum wordt gebruikt dan voor de teststof, moet er samen met de positieve controle op dezelfde plaat nog een VC ten minste in drievoud worden getest.

Kwaliteitscriteria voor de ER-agonismebepaling

17. De gemiddelde luciferase-activiteit van de positieve controle (1 nM E2) moet ten minste het 4-voudige zijn van het gemiddelde voor de VC op elke plaat. Dit criterium is vastgesteld op basis van de betrouwbaarheid van de eindpuntwaarden uit de valideringsstudie (historisch het 4- tot 30-voudige).

18. Voor de kwaliteitscontrole van de bepaling moet de x-voudige inductie die overeenkomt met de PC$_{10}$-waarde van de gelijktijdige positieve controle (1 nM E2), groter zijn dan 1+2SD van de x-voudige inductiewaarde (=1) van de gelijktijdige VC. Ten behoeve van de prioritering kan de PC$_{10}$-waarde nuttig zijn ter vereenvoudiging van de gegevensanalyse die vereist is in vergelijking met een statistische analyse. Hoewel een statistische analyse informatie geeft over de significantie, is een dergelijke analyse geen kwantitatieve parameter voor wat betreft het concentratie-afhankelijke potentieel en daarom minder nuttig voor prioritering.

Kwaliteitscriteria voor de ER-antagonismebepaling

19. De gemiddelde luciferase-activiteit van de spike-in-controle (25 pM E2) moet ten minste het 4-voudige zijn van het gemiddelde voor de VC op elke plaat. Dit criterium is vastgesteld op basis van de betrouwbaarheid van de eindpuntwaarden uit de valideringsstudie.

20. Voor de kwaliteitscontrole van de bepaling moet de relatieve transcriptionele activatie (RTA) van 1 nM E2 groter zijn dan 100 %, moet de RTA van 1 µM 4-hydroxytamoxifen (OHT) minder zijn dan 40,6 % en moet de RTA van 100 µM digitonine (Dig) minder zijn dan 0 %.

Aantoning van de bekwaamheid van laboratoria (zie punt 14 en de tabellen 3 en 4 onder "COMPONENTEN VAN DE ER TA-BEPALING" van deze testmethode).

Vehiculum

21. Als gelijktijdige VC wordt dimethylsulfoxide (DMSO) gebruikt, of een geschikt oplosmiddel, in dezelfde concentratie als voor de verschillende positieve en negatieve controles en voor de teststoffen. De teststoffen moeten worden opgelost in een oplosmiddel dat die teststof oplosbaar maakt en mengbaar is met het celmedium. Geschikte vehicula zijn water, ethanol (95 % tot 100 % zuiverheid) en DMSO. Als DMSO wordt gebruikt, mag het gehalte niet hoger zijn dan 0,1 % (v/v). Voor elk vehiculum moet worden aangetoond dat het maximale gebruikte volume niet cytotoxisch is en de prestaties van de bepaling niet verstoort.

Voorbereiding van de teststoffen

22. De teststoffen moeten in het algemeen worden opgelost in DMSO, of een ander geschikt oplosmiddel, en serieel worden verdund met hetzelfde oplosmiddel in een gemeenschappelijke verhouding van 1:10 om oplossingen voor verdunning met medium te bereiden.

Oplosbaarheid en cytotoxiciteit: overwegingen voor bereikbepaling

23. Er moet een inleidende test worden uitgevoerd om het passende concentratiebereik van de te testen chemische stof te bepalen en na te gaan of er oplosbaarheids- of cytotoxiciteitsproblemen zijn met de teststof. In eerste instantie worden de chemische stoffen getest tot een maximale concentratie van 1 µl/ml, 1 mg/ml, of 1 mM, welke van deze het laagste is. Op basis van de mate van cytotoxiciteit die of het gebrek aan oplosbaarheid dat in de inleidende test is waargenomen, moet de chemische stof in de eerste definitieve testrun worden getest bij log-seriële verdunningen die beginnen bij de maximale aanvaardbare concentratie (bv. 1 mM, 100 µM, 10 µM enz.), waarbij de aanwezigheid van troebelheid of neerslag of cytotoxiciteit moet worden opgemerkt. De concentraties in de tweede en zo nodig derde testrun moeten voor zover nodig worden aangepast om de concentratie-responscurve beter te kunnen karakteriseren en concentraties waarvan is gebleken dat ze onoplosbaar zijn of overmatige cytotoxiciteit induceren, te vermijden.

24. Voor ER-agonisten en -antagonisten kan het optreden van toenemende cytotoxiciteit de kenmerkende sigmoïdale respons aanzienlijk verstoren of tenietdoen. Bij het interpreteren van de gegevens moet hier dan ook rekening mee worden gehouden. Er moeten methoden voor het testen op cytotoxiciteit worden toegepast die informatie kunnen opleveren over het punt waarop de cellevensvatbaarheid 80 % is, met behulp van een passende bepaling op basis van laboratoriumervaring.

25. Wanneer de resultaten van de cytotoxiciteitstest uitwijzen dat de concentratie van de teststof het aantal cellen met 20 % of meer heeft doen afnemen, moet deze concentratie als cytotoxisch worden beschouwd en mogen de concentraties die gelijk zijn aan of hoger zijn dan de cytotoxische concentratie niet in de beoordeling worden meegenomen.

Blootstelling aan de teststof en indeling van de testplaat

26. De procedure voor de verdunning van de teststoffen (stappen 1 en 2) en de blootstelling van de cellen (stap 3) kan als volgt worden uitgevoerd:

Stap 1: Elke teststof moet serieel worden verdund in DMSO of een geschikt oplosmiddel en worden toegevoegd aan de putjes van een microtiterplaat om uit te komen op de uiteindelijke concentratiereeksen zoals bepaald in de voorbereidende bereikbepalingstest (doorgaans een reeks van bijvoorbeeld 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, en 10 pM (10^{-3}-10^{-11} M)) voor testen in drievoud.

Stap 2: Verdunning van de teststof: verdun eerst 1,5 µl van de teststof in het oplosmiddel tot een concentratie van 500 µl medium.

Stap 3: Blootstelling van de cellen aan de teststof: voeg 50 µl van de in medium verdunde teststof (bereid in stap 2) toe aan een putje van de testplaat met 10^4 cellen/100 µl/putje.

Aanbevolen wordt om uiteindelijk voor elk putje op een volume medium van 150 µl uit te komen. De testmonsters en referentiestandaarden kunnen worden gerangschikt zoals weergegeven in tabel 3 en tabel 4.

Tabel 3: Voorbeeldverdeling van de referentiestandaarden over de testplaat voor de ER-agonismebepaling

Rij	17α-methyltestosteron			Corticosteron			17α-oestradiol			E2		
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	conc. 1 (10 µM)	→	→	100 µM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	conc. 2 (1 µM)	→	→	10 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	conc. 3 (100 nM)	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	conc. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	conc. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	conc. 6 (100 nM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	conc. 7 (10 nM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: vehiculumcontrole (0,1 % DMSO); PC: positieve controle (1 nM E2)

27. De referentiestandaarden (E2, 17α-oestradiol, 17α-methyltestosteron en corticosteron) moeten in elke testrun worden meegenomen (tabel 3). De positievecontroleputjes behandeld met 1 nM E2 die een maximale inductie van E2 kunnen opwekken, en de VC-putjes behandeld met alleen DMSO (of geschikt oplosmiddel) moeten ook in elke testplaat worden opgenomen (tabel 4). Als er cellen van verschillende bronnen (bv. verschillend aantal passages, verschillende partij enz.) voor hetzelfde experiment worden gebruikt, moeten de referentiestandaarden voor elke celbron afzonderlijk worden getest.

Tabel 4: Voorbeeldverdeling van de teststoffen en plaatcontrolestoffen over de testplaat voor de ER-agonismebepaling

Rij	**Teststof 1**			**Teststof 2**			**Teststof 3**			**Teststof 4**		
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	conc. 1 (10 µM)	→	→	1 mM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→

B	conc. 2 (1 µM)	→	→	100 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	conc. 3 (100 nM)	→	→	10 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	conc. 4 (10 nM)	→	→	1 µM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	conc. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	conc. 6 (100 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	conc. 7 (10 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: vehiculumcontrole (0,1 % DMSO); PC: positieve controle (1 nM E2)

Tabel 5: Voorbeeldverdeling van de referentiestandaarden over de testplaat voor de ER-antagonismebepaling

Rij	**Tamoxifen**			**Flutamide**			**Teststof 1**			**Teststof 2**		
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	**conc. 1 (10 µM)**	→	→	**10 µM**	→	→	**10 µM**	→	→	**10 µM**	→	→
B	**conc. 2 (1 µM)**	→	→	**1 µM**	→	→	**1 µM**	→	→	**1 µM**	→	→
C	**conc. 3 (100 nM)**	→	→	**100 nM**	→	→	**100 nM**	→	→	**100 nM**	→	→
D	**conc. 4 (10 nM)**	→	→	**10 nM**	→	→	**10 nM**	→	→	**10 nM**	→	→
E	**conc. 5 (1 nM)**	→	→	**1 nM**	→	→	**1 nM**	→	→	**1 nM**	→	→
F	**conc. 6 (100 nM)**	→	→	**100 pM**	→	→	**100 pM**	→	→	**100 pM**	→	→
G	**0,1 % DMSO**	→	→	→	→	→	**1 µM OHT**	→	→	**100 µM Dig**	→	→
H	**VC**	→	→	→	→	→	**PC**	→	→	→	→	→

VC: vehiculumcontrole (0,1 % DMSO), PC: 1 nM E2, OHT: 4-hydroxytamoxifen, Dig: digitonine.

= bevat 25 pM E2 om de piek te produceren (spike-in-controle)

28. Om de antagonistische activiteit van chemische stoffen te bepalen wordt aan de testputjes in de rijen A tot en met G 25 pM E2 toegevoegd om de piek te produceren. De referentiestandaarden (tamoxifen en flutamide) moeten in elke testrun worden meegenomen. In elk testplaat moeten bovendien positievecontroleputjes behandeld met 1 nM E2, die kunnen dienen als kwaliteitscontrole voor de cellijn hERα-HeLa-9903, VC-putjes behandeld met DMSO (of geschikt oplosmiddel), met 0,1 % DMSO behandelde putjes, die zijn behandeld met DMSO toegevoegd aan de concentratie E2 die de piek produceert, en die zodoende overeenkomen met de "Spike-in-controle" (controle die de piek produceert), putjes behandeld met de eindconcentratie van 1 µM OHT en putjes behandeld met 100 µM Dig worden opgenomen (tabel 5). Bij volgende testplaten moet dezelfde indeling worden aangehouden zonder de referentiestandaardputjes (tabel 6). Als er cellen van verschillende bronnen (bv. verschillend aantal passages, verschillende partij enz.) voor hetzelfde experiment worden gebruikt, moeten de referentiestandaarden voor elke celbron afzonderlijk worden getest.

Tabel 6: Voorbeeldverdeling van de teststoffen en plaatcontrolestoffen over de testplaat voor de ER-antagonismebepaling

Rij	**Teststof 1**	**Teststof 2**	**Teststof 3**	**Teststof 4**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**conc. 1 (10 µM)**	→	→	**10 µM**	→	→	**10 µM**	→	→	**10 µM**	→	→
B	**conc. 2 (1 µM)**	→	→	**1 µM**	→	→	**1 µM**	→	→	**1 µM**	→	→
C	**conc. 3 (100 nM)**	→	→	**100 nM**	→	→	**100 nM**	→	→	**100 nM**	→	→
D	**conc. 4 (10 nM)**	→	→	**10 nM**	→	→	**10 nM**	→	→	**10 nM**	→	→
E	**conc. 5 (1 nM)**	→	→	**1 nM**	→	→	**1 nM**	→	→	**1 nM**	→	→
F	**conc. 6 (100 nM)**	→	→	**100 pM**	→	→	**100 pM**	→	→	**100 pM**	→	→
G	**0,1 % DMSO**	→	→	→	→	→	**1 µM OHT**	→	→	**100 µM Dig**	→	→
H	**VC**	→	→	→	→	→	**PC**	→	→	→	→	→

VC: vehiculumcontrole (0,1 % DMSO), PC: 1 nM E2, OHT: 4-hydroxytamoxifen, Dig: digitonine.

: bevat 25 pM E2 om de piek te produceren (spike-in-controle)

29. Voor zover van toepassing moet worden bevestigd dat er geen randeffecten optreden. Als er een vermoeden bestaat van randeffecten moet de plaatindeling worden aangepast om dergelijke effecten te vermijden. Er kan bijvoorbeeld voor worden gekozen om de putjes aan de randen niet te gebruiken.

30. Na toevoeging van de chemische stoffen moeten de testplaten gedurende 20-24 uur worden geïncubeerd in een 5 % CO_2-incubator bij 37 ± 1 ºC om de synthese van de reportergenproducten te induceren.

31. Indien verbindingen sterk vluchtig zijn is bijzondere aandacht geboden. In zulke gevallen kunnen naburige controleputjes namelijk vals-positieve uitkomsten genereren. Deze moeten dan ook worden bekeken in het licht van de verwachte en historische controlewaarden. In de zeldzame gevallen waarin vluchtigheid een probleem oplevert, kan het gebruik van "plaatsealers" de afzonderlijke putjes effectief helpen isoleren tijdens het testen. Dit wordt voor dergelijke gevallen dan ook aanbevolen.

32. Met het oog op de onafhankelijkheid van de resultaten moeten de herhalingen van de definitieve tests voor dezelfde chemische stof op een andere dag worden uitgevoerd.

Luciferasebepaling

33. Voor deze bepaling kan een in de handel verkrijgbaar luciferase-bepalingsreagens [bv. Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510, of gelijkwaardig)] of een standaard luciferasebepalingssysteem (bv. Promega, E1500, of gelijkwaardig) worden gebruikt, zolang maar aan de aanvaardbaarheidscriteria wordt voldaan. De reagentia voor de bepaling moeten worden geselecteerd op basis van de gevoeligheid van de te gebruiken luminometer. Bij gebruik van een standaard luciferasebepalingssysteem moet een celkweek-lysisreagens (bv. Promega, E1531, of gelijkwaardig) worden gebruikt, voordat het substraat wordt toegevoegd. Het luciferasereagens moet worden toegepast volgens de instructies van de fabrikant.

ANALYSE VAN DE GEGEVENS

ER-agonismebepaling

34. Bij een ER-agonismebepaling kan de relatieve transcriptionele activiteit ten opzichte van de positieve controle (1 nM E2) worden verkregen door de luminescentiesignalen van een en dezelfde plaat te analyseren aan de hand van de volgende stappen (andere, gelijkwaardige mathematische bewerkingen zijn ook aanvaardbaar):

Stap 1. Bereken de gemiddelde waarde voor de VC.

Stap 2. Trek de gemiddelde waarde voor de VC af van de waarde voor elk putje om de gegevens te normaliseren.

Stap 3. Bereken de gemiddelde waarde voor de genormaliseerde positieve controle.

Stap 4. Deel de genormaliseerde waarde voor elk putje in de plaat door de gemiddelde waarde voor de genormaliseerde positieve controle (positieve controle = 100 %).

Het eindresultaat voor elk putje is de relatieve transcriptionele activiteit voor dat putje in vergelijking met de positievecontrolerespons.

Stap 5. Bereken voor elke concentratiegroep van de teststof de gemiddelde waarde van de relatieve transcriptionele activiteit. De uitkomsten leveren tweeërlei informatie op: de gemiddelde transcriptionele activiteit (respons) en de concentratie waarbij de respons optreedt (zie volgende sectie).

Overwegingen bij de EC_{50}, PC_{50} en PC_{10}

35. Voor de berekening van de EC_{50} is de volledige concentratie-responscurve nodig, maar vanwege beperkingen van het testconcentratiebereik (bijvoorbeeld als gevolg van cytotoxiciteit of oplosbaarheidsproblemen) is het niet altijd mogelijk of praktisch haalbaar om deze op te nemen. Aangezien de EC_{50} en het maximale-inductieniveau (dat overeenkomt met de maximale waarde van de Hill-vergelijking) slechts ter informatie dienen, hoeven deze parameters echter alleen te worden vermeld indien mogelijk. Voor de berekening van de EC_{50} en het maximale-inductieniveau moet geschikte statistische software worden gebruikt (bv. Graphpad Prism). Als de logistische vergelijking van Hill niet toepasbaar is op de concentratie-responsgegevens, moet de EC_{50} aan de hand van de volgende vergelijking worden berekend (7):

$Y = \text{basis} + (\text{top} - \text{basis}) / (1 + 10 \exp((\log EC_{50} - X) \times \text{Hill-coëfficiënt}))$, waarbij:

X = de logaritme van de concentratie; en

Y = de respons; Y begint aan de basis en loopt in een sigmoïde curve naar de top. De basis wordt in de logistische vergelijking van Hill op nul gesteld.

36. Voor elke teststof moeten de volgende gegevens worden verkregen:

de RPC_{Max} (het maximale responsniveau dat door een teststof wordt opgewekt, uitgedrukt als percentage van de respons die wordt opgewekt door 1 nM E2 op dezelfde plaat) en de PC_{Max} (de concentratie die overeenkomt met de RPC_{Max}); en

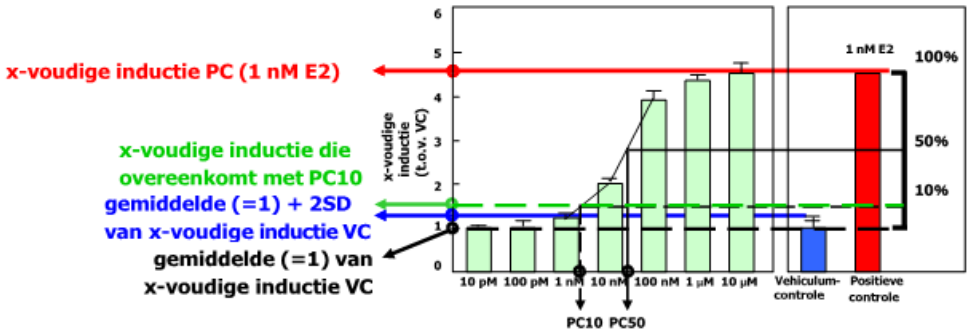
voor positieve chemische stoffen, de concentraties die de PC_{10} en, indien van toepassing, de PC_{50} opwekken.

37. De PC_x-waarde kan worden berekend door te interpoleren tussen 2 punten op de X-Y-curve, het ene direct boven en het andere direct onder een PC_x-waarde. Als deze punten direct boven en onder de PC_x-waarde respectievelijk de coördinaten (a,b) en (c,d) hebben, kan de PC_x worden berekend aan de hand van de volgende vergelijking:

$$\log[PC_x] = \log[c]+(x-d)/(d-b)$$

38. Beschrijvingen van positievecontrolewaarden worden hieronder weergegeven in figuur 1.

Figuur 1: Voorbeeld van de afleiding van positievecontrolewaarden. De positieve controle (1 nM E2) wordt opgenomen in elke testplaat



ER-antagonismebepaling

39. Bij een ER-antagonismebepaling kan de relatieve transcriptionele activiteit (RTA) ten opzichte van de spike-in-controle (25 pM E2) worden verkregen door de luminescentiesignalen van een en dezelfde plaat te analyseren aan de hand van de volgende stappen (andere, gelijkwaardige mathematische bewerkingen zijn ook aanvaardbaar):

Stap 1. Bereken de gemiddelde waarde voor de VC.

Stap 2. Trek de gemiddelde waarde voor de VC af van de waarde voor elk putje om de gegevens te normaliseren. Stap 3. Bereken de gemiddelde waarde voor de genormaliseerde spike-in-controle.

Stap 4. Deel de genormaliseerde waard voor elk putje in de plaat door de gemiddelde waarde voor de genormaliseerde spike-in-controle (spike-in-controle = 100 %).

Het eindresultaat voor elk putje is de relatieve transcriptionele activiteit voor dat putje in vergelijking met de spike-in-controlerespons.

Stap 5. Bereken voor elke behandeling de gemiddelde waarde van de relatieve transcriptionele activiteit.

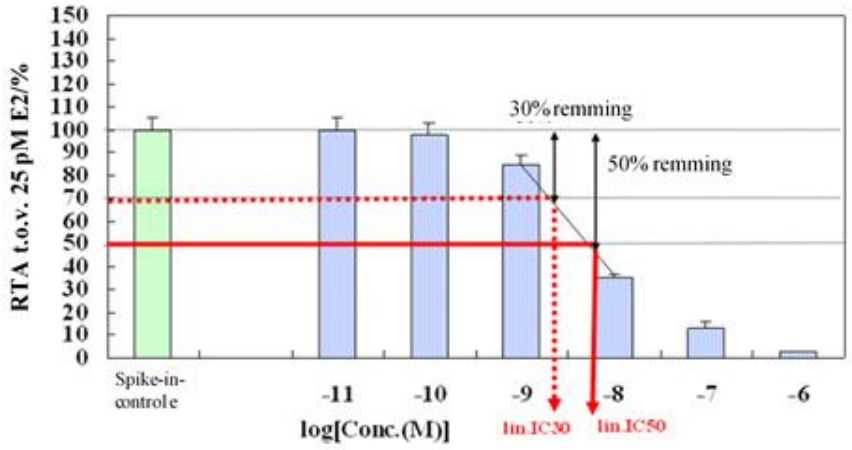
Overwegingen bij de IC_{30} en IC_{50}

40. Voor positieve chemische stoffen moeten de concentraties worden gegeven die de IC_{30} en, indien van toepassing, de IC_{50} opwekken.

41. De IC_x-waarde kan worden berekend door te interpoleren tussen 2 punten op de X-Y-curve, het ene direct boven en het andere direct onder een IC_x-waarde. Als deze punten direct boven en onder de IC_x-waarde respectievelijk de coördinaten (c,d) en (a,b) hebben, kan de IC_x worden berekend aan de hand van de volgende vergelijking:

$$\text{lin } IC_x = a - (b - (100 - x))\,(a - c)/(b - d)$$

Figuur 2: Voorbeeld van de afleiding van IC-waarden. De spike-in-controle (25 pM E2) wordt opgenomen in elke testplaat



RTA: relatieve transcriptionele activiteit

42. De resultaten moeten op twee (of drie) onafhankelijke testruns worden gebaseerd. Als twee testruns vergelijkbare en dus reproduceerbare resultaten opleveren, is het niet nodig een derde testrun uit te voeren. Om aanvaardbaar te zijn moeten de resultaten:

- aan de aanvaardbaarheidscriteria voldoen (zie Aanvaardbaarheidscriteria, punten 14-20),
- reproduceerbaar zijn.

Criteria voor gegevensinterpretatie

Tabel 7: Positieve en negatieve beslissingscriteria bij ER-agonismebepaling

Positief	Als in twee van de twee of ten minste twee van de drie testruns de verkregen RPC_{Max} gelijk is aan of sterker dan 10 % van de respons van de positieve controle.
Negatief	Als in twee van de twee of twee van de drie testruns de verkregen RPC_{Max} lager blijft dan 10 % van de respons van de positieve controle.

Tabel 8: Positieve en negatieve beslissingscriteria bij ER-antagonismebepaling

Positief	Als in twee van de twee of ten minste twee van de drie testruns de IC_{30} kan worden berekend.
Negatief	Als in twee van de twee of twee van de drie testruns de IC_{30} niet kan worden berekend.

43. De criteria voor gegevensinterpretatie staan in de tabellen 7 en 8. Positieve resultaten worden gekarakteriseerd door zowel de grootte van het effect als de concentratie waarbij het effect optreedt. Door de resultaten uit te drukken in de vorm van een concentratie waarbij 50 % (PC_{50}) of 10 % (PC_{10}) van de positievecontrolewaarden bereikt worden voor de agonismebepaling, en 50 % (IC_{50}) of 30 % (IC_{30}) van de spike-in-controlewaarde wordt

geremd voor de antagonismebepaling, worden deze beide doelen bereikt. Een teststof wordt echter als positief aangemerkt als in twee van de twee of ten minste twee van de drie testruns de maximale door de teststof opgewekte respons (RPC_{Max}) gelijk is aan of sterker dan 10 % van de respons van de positieve controle, terwijl een teststof als negatief wordt beschouwd als de RPC_{Max} in twee van de twee of twee van de drie testruns lager blijft dan 10 % van de respons van de positieve controle.

44. De PC_{10}, PC_{50} en PC_{Max} in een ER-agonismebepaling en de IC_{30} en IC_{50} in een ER-antagonismebepaling kunnen worden berekend met behulp van een spreadsheet die samen met de testrichtlijn te vinden is op de publiekswebsite van de OESO[1].

45. Over het algemeen is het voldoende om de PC_{10} of PC_{50} en de IC_{30} or IC_{50} ten minste tweemaal te bepalen. Mocht de resulterende basislijn voor gegevens in hetzelfde concentratiebereik echter een variabiliteit laten zien met een onaanvaardbaar hoge variatiecoëfficiënt (CV; %), dan kunnen de gegevens mogelijk niet als betrouwbaar worden beschouwd en moet de bron van de hoge variabiliteit worden opgespoord. De ruwe gegevens in drievoud (d.w.z. de gegevens voor de intensiteit van de luminescentie) van de gegevenspunten die worden gebruikt voor de berekening van de PC_{10}, moeten een CV hebben van minder dan 20 %.

46. Als aan de aanvaardbaarheidscriteria wordt voldaan, betekent dit weliswaar dat het bepalingssysteem naar behoren functioneert, maar wil dit nog niet zeggen dat een bepaalde testrun kloppende gegevens produceert. Duplicatie van de resultaten van de eerste testrun is de beste garantie dat de geproduceerde gegevens kloppen.

47. Wanneer er in het geval van de ER-agonismebepaling meer informatie nodig is behalve de screenings- en prioriteringsdoelstellingen van deze TG voor positieve teststoffen, in het bijzonder voor PC_{10}-PC_{49}-stoffen, alsmede stoffen waarbij overstimulatie van luciferase wordt vermoed, kan met behulp van een ERα-antagonist worden bevestigd dat de waargenomen luciferase-activiteit uitsluitend een ERα-specifieke respons is (zie aanhangsel 2.1).

TESTVERSLAG

48. Zie punt 20 van "COMPONENTEN VAN DE ER TA-BEPALING".

[1] http://www.oecd.org/env/testguidelines

LITERATUUR

(1) OESO (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(2) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.

(3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

(4) Spaepen M., *et al.* (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, FEMS Microbiol. Lett., 78(1), 89-94.

(5) Kobayashi H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, J. Vet. Med. Sci., 57(4), 769- 71.

(6) Dussurget O. and Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl.* Environ. *Microbiol*., 60(3), 953-9.

(7) De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, Am. J. *Physiol*., 235, E97-El02.

Aanhangsel 2.1

VALS-POSITIEVE RESULTATEN: BEOORDELING VAN NIET-RECEPTOR-GEMEDIEERDE LUMINESCENTIESIGNALEN

1. In de ER-agonismebepaling kunnen vals-positieve resultaten worden gegenereerd door niet-ER-gemedieerde activatie van het luciferasegen, rechtstreekse activatie van het genproduct of fluorescentie door onbepaalde oorzaak. Dergelijke effecten uiten zich in een onvolledige of ongebruikelijke dosis-responscurve. Als dergelijke effecten vermoed worden, moeten de effecten van een ER-antagonist (bv. 4- hydroxytamoxifen (OHT) in een niet-toxische concentratie) op de respons worden onderzocht. De pure antagonist ICI 182780 is mogelijk niet geschikt voor dit doel, omdat een voldoende hoge concentratie van ICI 182780 mogelijk de waarde voor de VC vermindert en daarmee de gegevensanalyse beïnvloedt.

2. Om de validiteit van deze benadering te waarborgen moeten in dezelfde plaat de volgende elementen worden getest:

- agonistische activiteit van de onbekende chemische stof met/zonder 10 µM OHT;
- VC (in drievoud);
- OHT (in drievoud);
- 1 nM E2 (in drievoud) als agonistische positieve controle;
- 1 nM E2 + OHT (in drievoud).

Criteria voor gegevensinterpretatie

Opmerking: Alle putjes moeten met dezelfde concentratie van het vehiculum worden behandeld.

- Als de agonistische activiteit van de onbekende chemische stof NIET beïnvloed wordt door de behandeling met de ER-antagonist, wordt deze als "Negatief" beschouwd.
- Als de agonistische activiteit van de onbekende chemische stof volledig geremd wordt, moeten de beslissingscriteria worden toegepast.
- Als de agonistische activiteit van de laagste concentratie gelijk is aan of sterker is dan de PC_{10}-respons, wordt de onbekende chemische stof in gelijke of sterkere mate geremd ten opzichte van de PC_{10}-respons. Het verschil in de responsen tussen de niet-behandelde en de behandelde putjes met de ER-antagonist wordt berekend en dit verschil wordt beschouwd als de werkelijke respons en moet worden gebruikt voor de berekening van de parameters die nodig zijn om te beslissen over de indeling van de chemische stof.

Gegevensanalyse

Controleer de prestatienorm.

Controleer de CV tussen de putjes die onder gelijke omstandigheden behandeld zijn.

1. Bereken het gemiddelde voor de VC
2. Trek het gemiddelde van de VC af van de waarde van elk putje dat **niet** met OHT is behandeld
3. Bereken het gemiddelde voor OHT
4. Trek het gemiddelde van de VC af van de waarde van elk putje dat met OHT is behandeld
5. Bereken het gemiddelde voor de positieve controle
6. Bereken de relatieve transcriptionele activiteit van alle andere putjes ten opzichte van de positieve controle.

Aanhangsel 2.2

BEREIDING VAN MET MET DEXTRAAN BEKLEDE KOOL (DCC) BEHANDELD SERUM

1. Behandeling van serum met met dextraan beklede kool (DCC) is een algemene methode om oestrogene verbindingen te verwijderen uit het serum dat aan het celmedium wordt toegevoegd, om elke invloed op de respons door residuele oestrogenen in het serum uit te sluiten. Met deze procedure kan 500 ml foetaal runderserum (FBS) worden behandeld.

Onderdelen

2. De volgende materialen en uitrusting zijn nodig:

Materiaal

Actieve kool

Dextraan

Magnesiumchloridehexahydraat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)

Sacharose

1 M HEPES-bufferoplossing (pH 7,4)

Ultrazuiver water geproduceerd met een filtersysteem

Uitrusting

Geautoclaveerde glazen kolf (maat aan te passen naar behoefte) gewone laboratoriumcentrifuge (waarbij de temperatuur kan worden ingesteld op 4 °C)

Procedure

3. De volgende procedure is aangepast voor gebruik van centrifugebuizen van 50 ml:

[Dag 1] Bereid een DCC-suspensie met 1 l ultrazuiver water dat 1,5 mM $MgCl_2$, 0,25 M sucrose, 2,5 g kool, 0,25 g dextraan en 5 mM HEPES bevat, en roer gedurende een nacht bij 4°C.

[Dag 2] Verdeel de suspensie over centrifugebuizen van 50 ml en centrifugeer gedurende 10 minuten bij 10 000 rpm bij 4 °C. Verwijder het supernatant en bewaar de helft van het koolsediment bij 4 °C voor gebruik op Dag 3. Suspendeer de andere helft van de kool met FBS dat voorzichtig ontdooid is om precipitatie te vermijden en gedurende 30 minuten bij 56 °C door warmte geïnactiveerd is, en breng het over in een geautoclaveerde glazen kolf zoals een erlenmeyer. Roer deze suspensie voorzichtig gedurende een nacht bij 4 °C.

[Dag 3] Verdeel de suspensie met FBS over centrifugebuizen van 50 ml om gedurende

10 minuten te centrifugeren bij 10 000 rpm bij 4 °C. Verzamel het FBS en breng het over bij het op Dag 2 bereide en bewaarde verse koolsediment. Suspendeer het koolsediment en roer de suspensie voorzichtig gedurende een nacht bij 4 °C in een geautoclaveerde glazen kolf.

[Dag 4] Verdeel de suspensie om gedurende 10 minuten te centrifugeren bij 10 000 rpm bij 4 °C en steriliseer het supernatant door het te filteren door een 0,2 µm steriel filter. Dit met DCC behandelde FBS moet worden bewaard bij -20 °C en blijft tot een jaar te gebruiken.

AANHANGSEL 3

TRANSACTIVATIEBEPALING OP BASIS VAN DE OESTROGEENRECEPTOR VAN VM7LUC VOOR HET IDENTIFICEREN VAN AGONISTEN EN ANTAGONISTEN VAN DE OESTROGEENRECEPTOR

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN (ZIE OOK ALGEMENE INLEIDING)

1. Voor deze bepaling wordt de cellijn VM7Luc4E2 gebruikt[1]. De bepaling is gevalideerd door twee Amerikaanse instanties: het National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) en het Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) (1). De VM7Luc-cellijnen brengen voornamelijk endogene ERα tot expressie en een geringe hoeveelheid endogene ERβ (2) (3) (4).

2. Deze bepaling is geschikt voor een breed spectrum aan stoffen, mits ze kunnen worden opgelost in dimethylsulfoxide (DMSO; CAS RN 67-68-5*)*, niet met DMSO of het celkweekmedium reageren en in de geteste concentraties niet cytotoxisch zijn. Als het niet mogelijk is om DMSO te gebruiken, kan een ander vehiculum zoals ethanol of water worden gebruikt (zie punt 12). Uit de bewezen prestaties van de VM7Luc-ER TA-(ant)agonismebepaling kan worden opgemaakt dat gegevens die met deze bepaling worden gegenereerd informatie zouden kunnen verschaffen over ER-gemedieerde werkingsmechanismen en gebruikt zouden kunnen worden voor de prioritering van stoffen voor nadere testen.

3. Deze bepaling is speciaal ontworpen voor het opsporen van hERα- en hERβ-gemedieerde TA door meting van chemiluminescentie als eindpunt. Omdat luminescentie een hoge signaal-achtergrondverhouding heeft, wordt chemiluminescentie veel gebruikt in bioassays

[1] Tot juni 2016 werd deze cellijn aangeduid als BG1Luc. BG-1-cellen werden voor het eerst beschreven door Geisinger et al. (1998) (12) en werden later gekarakteriseerd door onderzoekers verbonden aan het Amerikaanse National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (13). Vrij recentelijk werd ontdekt dat er twee verschillende varianten bestaan van de BG-1-cellen die door onderzoekers worden gebruikt: BG-1 FR en BG-1 NIEHS. Een uitvoerige analyse, inclusief DNA-tests, van deze twee BG-1-cellijnvarianten, uitgevoerd door Li et al. (2014) (14) wees uit dat BG-1 FR uniek was, terwijl BG-1 NIEHS, de oorspronkelijke cellijn die werd gebruikt bij de ontwikkeling van de bepaling, niet de humane ovariumcarcinoomcellijn BG1 was, maar een variant van de humane borstkankercellijn MCF7. De in de bepaling gebruikte cellijn, die oorspronkelijk werd aangeduid als BG1Luc4E2 (15), zal voortaan VM7Luc4E2 worden genoemd ("V"= variant; "M7" = MCF7-cellen). Evenzo komt de bepaling nu VM7Luc-ER TA-bepaling te heten. Hoewel dit de herkomst van de cellijn waarop de bepaling is gebaseerd, verandert, heeft het geen invloed op de gepubliceerde valideringsstudies, noch op de bruikbaarheid en de toepassing van deze bepaling voor de screening van oestrogene/anti-oestrogene chemische stoffen.

(10). De activiteit van vuurvlieg-luciferase in bepalingen op celbasis kan echter worden verstoord door stoffen die het luciferase-enzym remmen, zodat ze als gevolg van de stabilisatie van het luciferine een schijnbare remming of verhoging van de luminescentie veroorzaken (10). Bovendien zijn er in sommige ER-reportergenbepalingen op basis van luciferase niet-receptor-gemedieerde luminescentiesignalen gemeld bij fyto-oestrogeenconcentraties hoger dan 1 µM als gevolg van overactiviteit van het luciferasereportergen (9) (11). Hoewel de dosis-responscurve aangeeft dat er bij lagere concentraties daadwerkelijk activatie van het ER-systeem optreedt, moet de luciferase-expressie bij hoge concentraties fyto-oestrogenen of soortgelijke verbindingen waarvan vermoed wordt dat zij fyto-oestrogeenachtige overactivatie van het luciferasereportergen kunnen veroorzaken, in ER STTA-bepalingssystemen zorgvuldig worden bestudeerd (see Appendix 2).

4. Alvorens deze bepaling te gebruiken met het oog op regelgeving, moeten de "ALGEMENE INLEIDING" en "COMPONENTEN VAN DE ER TA-BEPALING" worden geraadpleegd. De in deze testmethode gebruikte definities en afkortingen staan in aanhangsel 1.

PRINCIPE VAN DE BEPALING (ZIE OOK DE ALGEMENE INLEIDING)

5. De bepaling wordt gebruikt voor het detecteren van ER-ligandbinding, gevolgd door de translocatie van het receptor-ligandcomplex naar de nucleus. In de nucleus bindt het receptor-ligandcomplex aan specifieke DNA-responselementen en transactiveert het het reportergen (*luc*), wat leidt tot de aanmaak van luciferase en vervolgens de emissie van licht, dat kan worden gekwantificeerd met behulp van een luminometer. De luciferase-activiteit kan snel en goedkoop worden bepaald met behulp van een aantal in de handel verkrijgbare kits. In de VM7Luc-ER TA wordt gebruikgemaakt van een ER-responsieve, uit de menselijke borst verkregen adenocarcinoomcellijn, VM7, die stabiel getransfecteerd is met een vuurvlieg-*luc* reporterconstruct, gestuurd door vier oestrogeenresponselementen die stroomopwaarts van de promotor van het muizen-borstkankervirus (MMTV) zijn geplaatst, voor het detecteren van stoffen met ER-agonistische of -antagonistische activiteit in vitro. Deze MMTV-promotor vertoont slechts geringe kruisreactiviteit met andere steroïde en niet-steroïde hormonen (8). De criteria voor gegevensinterpretatie worden nader beschreven in punt 41. Samengevat wordt een positieve respons gekenmerkt door een concentratie-responscurve die ten minste drie punten bevat met niet-overlappende foutbalken (gemiddelde ± standaarddeviatie), en een verandering in de amplitude (genormaliseerde relatieve lichteenheden [RLU]) van ten minste 20 % van de maximale waarde voor de referentiestandaard (17β-oestradiol [E2; CAS RN 50-28-2] voor de agonismebepaling, raloxifeen HCl [Ral; CAS RN 84449-90-1]/E2 voor de antagonismebepaling).

PROCEDURE

Cellijn

6. Voor de bepaling moet de stabiel getransfecteerde cellijn VM7Luc4E2 worden gebruikt. Deze cellijn is op dit moment alleen verkrijgbaar met een technische licentieovereenkomst bij de Universiteit van Californië, Davis, Californië, VS[1] en bij Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, North Carolina, VS[2].

Stabiliteit van de cellijn

7. Om de stabiliteit en de integriteit van de cellijn te behouden moeten de cellen in meerdere passages uit de bevroren voorraad worden gekweekt in medium voor het in stand houden van cellen (zie punt 9). De cellen mogen niet meer dan 30 passages worden gekweekt. Voor de cellijn VM7Luc4E2 komen 30 passages overeen met ongeveer drie maanden.

Omstandigheden voor het kweken en uitplaten van de cellen

8. Om de kwaliteit van alle materialen en methoden te waarborgen en zo de integriteit, validiteit en reproduceerbaarheid van het verrichte werk te garanderen moeten de procedures beschreven in de leidraad voor goede celkweekpraktijken (Guidance on Good Cell Culture Practice) (5) (6) worden gevolgd.

9. De VM7Luc4E2-cellen worden bewaard in RPMI 1640-medium aangevuld met 0,9 % Pen-Strep en 8,0 % foetaal runderserum (FBS) in een speciaal daarvoor bestemde weefselkweekincubator bij 37 °C ± 1 °C, 90 % ± 5 % vochtigheid en 5,0 % ± 1 % CO_2/lucht.

10. Zodra ~80 % confluentie wordt bereikt, worden de VM7Luc4E2-cellen overgeënt en gedurende 48 uur geconditioneerd in een oestrogeenvrij milieu, alvorens te worden uitgeplaat in microtiterplaten met 96 putjes voor de blootstelling aan de teststoffen en de analyse van de oestrogeen-afhankelijke inductie van luciferase-activiteit. Oestrogeen-vrij medium (EFM) bevat Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) zonder fenolrood, aangevuld met 4,5 % DCC-FBS, 1,9 % L-glutamine en 0,9 % Pen-Strep. Alle kunststof laboratoriumgerei moet vrij zijn van oestrogene activiteit [zie gedetailleerd protocol (7)].

Aanvaardbaarheidscriteria

---

[1] Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616 Verenigde Staten, e-mail: msdenison@ucdavis.edu, telefoon: (530) 754-8649.

[2] Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 Verenigde Staten, e-mail: info@dioxins.com, telefoon: 919-688-4804, Fax: 919-688-4404.

11. Of een test aanvaard of verworpen wordt, hangt af van de beoordeling van de resultaten voor de referentiestandaarden en de controles van elk op een plaat met 96 putjes uitgevoerd experiment. Elke referentiestandaard wordt in verschillende concentraties getest en voor elke referentie- en controleconcentratie wordt de bepaling meerdere keren herhaald. De resultaten worden vergeleken met kwaliteitscontroles (QC) voor deze parameters die zijn afgeleid uit de databanken met historische agonisme- en antagonismegegevens die door elk laboratorium zijn gegenereerd bij de bekwaamheidstoetsing. De databanken met historische gegevens worden doorlopend bijgewerkt met nieuwe resultaten voor referentiestandaarden en controles. Bij veranderingen in uitrusting of laboratoriumomstandigheden kan het nodig zijn om bijgewerkte databanken met historische gegevens te genereren.

Agonismetest

Bereikbepalingstest

- Inductie: het geïnduceerde effect op de plaat wordt gemeten door de gemiddelde maximale RLU-waarde met de referentiestandaard E2 te delen door de gemiddelde RLU-waarde voor de DMSO-controle. Doorgaans wordt een vijfvoudige inductie waargenomen, maar een experiment is aanvaardbaar als ten minste een viervoudige inductie wordt verkregen.
- Resultaten voor de DMSO-controle: de RLU-waarden voor de oplosmiddelcontrole mogen maximaal 2,5 maal de standaarddeviatie van de gemiddelde historische RLU-waarde voor de oplosmiddelcontrole afwijken.
- Een experiment dat niet voldoet aan een van beide aanvaardbaarheidscriteria, moet worden verworpen en herhaald.

Integrale test

Voor deze test gelden aanvaardbaarheidscriteria van de bereikbepalingstest voor de agonismebepaling, alsmede de volgende criteria:

- Resultaten voor de referentiestandaard: de concentratie-responscurve voor de referentiestandaard E2 moet een sigmoïdale vorm hebben en er moeten ten minste drie waarden binnen het lineaire gedeelte van de concentratie-responscurve vallen.
- Resultaten voor de positieve controle: de RLU-waarden voor de methoxychloorcontrole moeten hoger zijn dan de gemiddelde waarde voor DMSO plus driemaal de standaarddeviatie van de gemiddelde waarde voor DMSO.
- Een experiment dat niet voldoet aan een van de aanvaardbaarheidscriteria, moet worden verworpen en herhaald.

Antagonismetest

Bereikbepalingstest

- Remming: het remmende effect op de plaat wordt gemeten door de gemiddelde maximale RLU-waarde met de referentiestandaard E2 te delen door de gemiddelde RLU-waarde

voor de DMSO-controle. Doorgaans wordt een vijfvoudige remming waargenomen, maar een experiment is aanvaardbaar als ten minste een drievoudige remming wordt verkregen.

- Resultaten voor de E2-controle: de RLU-waarden voor de E2-controle mogen maximaal 2,5 maal de standaarddeviatie van de gemiddelde historische RLU-waarde voor de E2-controle afwijken.
- Resultaten voor de DMSO-controle: de RLU-waarden voor de DMSO-controle mogen maximaal 2,5 maal de standaarddeviatie van de gemiddelde historische RLU-waarde voor de oplosmiddelcontrole afwijken.
- Een experiment dat niet voldoet aan een van de aanvaardbaarheidscriteria, wordt verworpen en herhaald.

Integrale test

Voor deze test gelden aanvaardbaarheidscriteria van de bereikbepalingstest voor de antagonismebepaling, alsmede de volgende criteria:

- Resultaten voor de referentiestandaard: de concentratie-responscurve voor de referentiestandaard Ral/E2 moet een sigmoïdale vorm hebben en er moeten ten minste drie waarden binnen het lineaire gedeelte van de concentratie-responscurve vallen.
- Resultaten voor de positieve controle: de RLU-waarden voor de tamoxifen/E2-controle moeten lager zijn dan de gemiddelde waarde voor de E2-controle minus driemaal de standaarddeviatie van de gemiddelde waarde voor de E2-controle.
- Een experiment dat niet voldoet aan een van de aanvaardbaarheidscriteria, wordt verworpen en herhaald.

Referentiestandaarden, positieve en vehiculumcontroles

Vehiculumcontroles (agonisme- en antagonismebepalingen)

12. Het te gebruiken vehiculum voor het oplossen van de teststoffen moet worden getest als vehiculumcontrole. Bij de validering van de VM7Luc-ER TA-bepaling werd 1 % (v/v) dimethylsulfoxide (DMSO, CAS RN 67-68-5) als vehiculum gebruikt (zie punt 24). Als een ander vehiculum dan DMSO wordt gebruikt, moeten alle referentiestandaarden, controles en teststoffen voor zover mogelijk in hetzelfde vehiculum worden getest.

Referentiestandaard (bereikbepaling agonisme)

13. De referentiestandaard is E2 (CAS RN 50-28-2). Voor de bereikbepalingstest wordt een verdunningsreeks van de referentiestandaard gemaakt bestaande uit vier concentraties E2 ($1{,}84 \times 10^{-10}$, $4{,}59 \times 10^{-11}$, $1{,}15 \times 10^{-11}$ en $2{,}87 \times 10^{-12}$ M), waarbij elke concentratie in twee putjes wordt getest.

Referentiestandaard (integrale agonismetest)

14. Voor de integrale test wordt een 1:2 verdunningsreeks van E2 gemaakt bestaande uit 11 concentraties E2 (lopend van $3{,}67 \times 10^{-10}$ tot $3{,}59 \times 10^{-13}$ M), die elk in twee putjes worden getest.

Referentiestandaard (bereikbepaling antagonisme)

15. De referentiestandaard is een combinatie van Ral (CAS RN 84449-90-1) en E2 (CAS RN 50-28-2). Voor de bereikbepalingstest wordt een verdunningsreeks van Ral/E2 gemaakt bestaande uit drie concentraties Ral ($3{,}06 \times 10^{-9}$, $7{,}67 \times 10^{-10}$, en $1{,}92 \times 10^{-10}$ M) plus een vaste concentratie E2 ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M), waarbij elke verdunning in twee putjes wordt getest.

Referentiestandaard (integrale antagonismetest)

16. Voor de integrale test wordt een 1:2 verdunningsreeks van Ral gemaakt (lopend van $2{,}45 \times 10^{-8}$ tot $9{,}57 \times 10_{-11}$ M) plus een vaste concentratie E2 ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M) om zo tot negen concentraties Ral/E2 te komen, die elk in twee putjes wordt getest.

Zwakke positieve controle (agonisme)

17. De zwakke positieve controle is $9{,}06 \times 10^{-6}$ M *p,p'*-methoxychloor (methoxychloor; CAS RN 72-43-5) in EFM.

Zwakke positieve controle (antagonisme)

18. De zwakke positieve controle bestaat uit tamoxifen (CAS RN 10540-29-1) $3{,}36 \times 10^{-6}$ M met $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 in EFM.

E2-controle (alleen voor antagonismebepaling)

19. De E2-controle is $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 in EFM en wordt gebruikt als negatieve basislijncontrole.

X-voudige inductie (agonisme)

20. De inductie van luciferaseactiviteit door de referentiestandaard (E2) wordt gemeten door de gemiddelde maximale RLU-waarde voor de referentiestandaard E2 te delen door de gemiddelde RLU-waarde voor de DMSO-controle. Het resultaat moet groter zijn dan viervoudig.

X-voudige remming (antagonisme)

21. De gemiddelde luciferaseactiviteit voor de referentiestandaard (Ral/E2) wordt gemeten door de gemiddelde maximale RLU-waarde voor de referentiestandaard Ral/E2 te delen door de gemiddelde RLU-waarde voor de DMSO-controle. Het resultaat moet groter zijn dan drievoudig.

Aantoning van de bekwaamheid van laboratoria (zie punt 14 en de tabellen 3 en 4 onder "COMPONENTEN VAN DE ER TA-BEPALING" van deze testmethode).

Vehiculum

22. De teststoffen moeten worden opgelost in een oplosmiddel dat de teststof oplosbaar maakt en mengbaar is met het celmedium. Geschikte vehicula zijn water, ethanol (95 % tot 100 %

zuiverheid) en DMSO. Als DMSO wordt gebruikt, mag het gehalte niet hoger zijn dan 1% (v/v). Voor elk vehiculum moet worden aangetoond dat het maximale gebruikte volume niet cytotoxisch is en de prestaties van de bepaling niet verstoort. De referentiestandaarden en controles worden eerst opgelost in 100 % oplosmiddel en vervolgens verdund tot de gewenste concentraties in EFM.

Voorbereiding van de teststoffen

23. De teststoffen worden eerst opgelost in 100 % DMSO (of geschikt oplosmiddel) en vervolgens verdund tot de gewenste concentraties in EFM. Alvorens te worden opgelost en verdund moeten alle teststoffen de gelegenheid krijgen om te equilibreren op kamertemperatuur. De teststofoplossingen moeten voor elk experiment vers bereid worden. Er mag geen neerslag of troebelheid in zichtbaar zijn. Stamoplossingen van referentiestandaarden en controles mogen wel in bulk worden bereid, maar de uiteindelijke referentiestandaard, controleverdunningen en teststoffen moeten voor elk experiment vers worden bereid en binnen 24 uur na bereiding worden gebruikt.

Oplosbaarheid en cytotoxiciteit: overwegingen voor bereikbepaling

24. De bereikbepalingstests bestaat uit een 1:10 verdunningsreeks van zeven concentraties in duplo. Eerst worden de teststoffen getest tot de maximumconcentratie van 1 mg/ml (~1 mM) voor agonisme en 20 μg/ml (~10 μM) voor antagonisme. De bereikbepalingsexperimenten worden gebruikt voor het bepalen van:

- de beginconcentraties van de teststof die in de integrale test gebruikt zullen worden;
- de verdunningen (1:2 of 1:5) van de teststof die in de integrale test gebruikt zullen worden.

25. In de protocollen voor de agonismebepaling en de antagonismebepaling (7) is een beoordeling opgenomen van de cellevensvatbaarheid en de cytotoxiciteit. Deze maakt zowel deel uit van de bereikbepalingstest als van de integrale test. De cytotoxiciteitstestmethode die werd gebruikt om de cellevensvatbaarheid te beoordelen bij de validering van de VM7Luc-ER TA-bepaling (1), was een kwalitatieve methode op basis van visuele waarneming en een beoordelingsschaal; er kan echter ook een kwantitatieve methode worden gebruikt voor het bepalen van de cytotoxiciteit (zie protocol (7)). Gegevens van teststofconcentraties die meer dan 20 % vermindering van de levensvatbaarheid veroorzaken, zijn niet bruikbaar.

Blootstelling aan de teststof en indeling van de testplaat

26. De cellen worden geteld en uitgeplaat in weefselkweekplaten met 96 putjes (2×10^5 cellen per putje) in EFM en vervolgens 24 uur geïncubeerd zodat de cellen zich aan de plaat kunnen hechten. Het EFM wordt verwijderd en vervangen door test- en referentiestoffen in EFM, waarna de plaat 19-24 uur wordt geïncubeerd. Bij sterk vluchtige stoffen is bijzondere aandacht geboden omdat naburige controleputjes vals-positieve resultaten kunnen genereren.

In zulke gevallen kunnen plaatsealers helpen om de afzonderlijke putjes effectief te isoleren tijdens het testen. Deze worden dan ook aanbevolen.

Bereikbepalingstests

27. In de bereikbepalingstests worden alle putjes van een plaat met 96 putjes gebruikt om tot zes teststoffen te testen in een 1:10 verdunningsreeks van zeven concentraties in duplo (zie figuren 1 en 2).

- In de bereikbepalingstest voor de *agonismebepaling* worden vier concentraties E2 in duplo als referentiestandaard gebruikt en vier duploputjes voor de DMSO-controle.
- In de bereikbepalingstest voor de *antagonismebepaling* worden drie concentraties Ral/E2 met $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 in duplo als referentiestandaard gebruikt en drie duploputjes voor de E2- en DMSO-controles.

Figuur 1: Indeling van de plaat met 96 putjes voor de bereikbepalingstest voor de agonismebepaling

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Afkortingen: E2-1 tot E2-4 = concentraties van de referentiestandaard E2 (van hoog tot laag); TC1-1 tot TC1-7 = concentraties (van hoog tot laag) van teststof 1 (TC1); TC2-1 tot TC2-7 = concentraties (van hoog tot laag) van teststof 2 (TC2); TC3-1 tot TC3-7 = concentraties (van hoog tot laag) van teststof 3 (TC3); TC4-1 tot TC4-7 = concentraties (van hoog tot laag) van teststof 4 (TC4); TC5-1 tot TC5-7 = concentraties (van hoog tot laag) van teststof 5 (TC5); TC6-1 tot TC6-7 = concentraties (van hoog tot laag) van teststof 6 (TC6); VC = vehiculumcontrole (DMSO [1 % v/v/ EFM]).

Figuur 2: Indeling van de plaat met 96 putjes voor de bereikbepalingstest voor de antagonismebepaling

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Afkortingen: E2 = E2-controle; Ral-1 tot Ral-3 = concentraties van de referentiestandaard raloxifeen/E2 (van hoog tot laag); TC1-1 tot TC1-7 = concentraties (van hoog tot laag) van teststof 1 (TC1); TC2-1 tot TC2-7 = concentraties (van hoog tot laag) van teststof 2 (TC2); TC3-1 tot TC3-7 = concentraties (van hoog tot laag) van teststof 3 (TC3); TC4-1 tot TC4-7 = concentraties (van hoog tot laag) van teststof 4 (TC4); TC5-1 tot TC5-7 = concentraties (van hoog tot laag) van teststof 5 (TC5); TC6-1 tot TC6-7 = concentraties (van hoog tot laag) van teststof 6 (TC6); VC = vehiculumcontrole (DMSO [1 % v/v/ EFM]).

Opmerking: Alle teststoffen worden getest met E2 in een concentratie van $9{,}18 \times 10^{-11}$ M.

28. Aanbevolen wordt om uiteindelijk voor elk putje op een volume medium van 200 µl uit te komen. Gebruik alleen testplaten waarin de cellen in alle putjes een levensvatbaarheid van 80 % of meer laten zien.

29. De bepaling van de beginconcentraties voor de integrale ***agonismebepaling*** wordt uitvoerig beschreven in het protocol voor deze bepaling (7). Samengevat worden de volgende criteria gebruikt:

- als er op de concentratiecurve van de teststof geen punten boven het gemiddelde plus driemaal de standaarddeviatie van de DMSO-controle liggen, wordt de integrale test uitgevoerd met een 1:2 verdunningsreeks van 11 concentraties beginnend bij de maximaal oplosbare concentratie;
- als er op de concentratiecurve van de teststof wel punten boven het gemiddelde plus driemaal de standaarddeviatie van de DMSO-controle liggen, dan moet de beginconcentratie voor de verdunningsreeks van 11 concentraties in de integrale test één log hoger zijn dan de concentratie met de hoogste gecorrigeerde RLU-waarde in de bereikbepalingstest. Voor de 11 concentraties wordt hetzij een 1:2 hetzij een 1:5 verdunningsreeks gekozen, afhankelijk van de volgende criteria:

  er moet een 1:2 verdunningsreeks van 11 concentraties worden gebruikt als het aldus verkregen concentratiebereik het volledige responsbereik op basis van de in de bereikbepalingstest gegenereerde concentratie-responscurve beslaat. Anders moet een 1:5 verdunningsreeks worden gebruikt;

- als een teststof in de bereikbepalingstest een tweefasige concentratie-responscurve laat zien, moeten beide fasen ook in de integrale test bestudeerd worden.

30. De bepaling van de beginconcentraties voor de integrale ***antagonismebepaling*** wordt uitvoerig beschreven in het protocol voor deze bepaling (7). Samengevat worden de volgende criteria gebruikt:

- als er op de concentratiecurve van de teststof geen punten onder het gemiddelde minus driemaal de standaarddeviatie van de E2-controle liggen, wordt de integrale test uitgevoerd met een 1:2 verdunningsreeks van 11 concentraties beginnend bij de maximaal oplosbare concentratie;
- als er op de concentratiecurve van de teststof wel punten onder het gemiddelde minus driemaal de standaarddeviatie van de E2-controle liggen, dan moet voor de verdunningsreeks van 11 concentraties in de integrale test een van de volgende beginconcentraties worden gebruikt:
  - de concentratie met de laagste gecorrigeerde RLU-waarde in de bereikbepalingstest;
  - de maximaal oplosbare concentratie (zie antagonismeprotocol (7), figuur 14-2);
  - de laagste cytotoxische concentratie (zie antagonismeprotocol (7), figuur 14-3 voor een gerelateerd voorbeeld);

- voor de 11 concentraties wordt hetzij een 1:2 hetzij een 1:5 verdunningsreeks gekozen, afhankelijk van de volgende criteria:

  er moet een 1:2 verdunningsreeks van 11 concentraties worden gebruikt als het aldus verkregen concentratiebereik het volledige responsbereik op basis van de in de bereikbepalingstest gegenereerde concentratie-responscurve beslaat. Anders moet een 1:5 verdunningsreeks worden gebruikt.

Integrale tests

31. De integrale test bestaat uit verdunningsreeksen van 11 concentraties (hetzij 1:2, hetzij 1:5, naargelang van de beginconcentratie op basis van de criteria voor de integrale test), die elk worden getest in drie putjes van de plaat met 96 putjes (zie figuren 3 en 4).

- Voor de integrale *agonismebepaling* worden 11 concentraties van E2 in duplo als referentiestandaard gebruikt. In elke plaat worden vier duploputjes voor de DMSO-controle en vier duploputjes voor de methoxychloorcontrole ($9{,}06 \times 10^{-6}$ M) opgenomen.
- Voor de integrale *antagonismebepaling* worden negen concentraties Ral/E2 met $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 in duplo als referentiestandaard gebruikt, met vier duploputjes voor de $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2-controle, vier duploputjes voor de DMSO-controles, en vier duploputjes voor $3{,}36 \times 10^{-6}$M tamoxifen.

Figuur 3: Indeling van de plaat met 96 putjes voor de integrale agonismebepaling

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

Afkortingen: TC11-1 tot TC1-11 = concentraties (van hoog tot laag) van teststof 1; TC2-1 tot TC2-11 = concentraties (van hoog tot laag) van teststof 2; E2-1 tot E2-11 = concentraties van de referentiestandaard E2 (van hoog tot laag); Meth = zwak positieve controle met *p*,*p*'-methoxychloor; VC = vehiculumcontrole (DMSO [1 % v/v/ EFM])

Figuur 4: Indeling van de plaat met 96 putjes voor de integrale antagonismebepaling

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Afkortingen: E2 = E2-controle; Ral-1 tot Ral-9 = concentraties van de referentiestandaard raloxifeen/E2 (van hoog tot laag); Tam = zak-positieve controle met tamoxifen/E2; TC1-1 tot TC1-11 = concentraties (van hoog tot laag) van teststof 1 (TC1); TC2-1 tot TC2-11 = concentraties (van hoog tot laag) van teststof 2 (TC2); VC = vehiculumcontrole (DMSO [1 % v/v/ EFM]).

Opmerking: zoals aangegeven bevatten alle referentie- en testputjes een vaste concentratie E2 ($9{,}18 \times 10^{-11}$M)

32. Met het oog op de onafhankelijkheid van de resultaten moeten de herhalingen van de integrale tests voor dezelfde chemische stof op een andere dag worden uitgevoerd. Er moeten ten minste twee integrale tests worden uitgevoerd. Als de testresultaten niet overeenstemmen (d.w.z. de ene test is positief, de andere negatief) of als een van de tests niet aanvaardbaar is, moet een extra derde test worden uitgevoerd.

Luminescentiemeting

33. De luminescentie wordt gemeten in een bereik van 300 tot 650 nm met behulp van een luminometer met injector en met software die het injectievolume en het meetinterval aanstuurt (7). De lichtemissie uit elk putje wordt uitgedrukt in RLU per putje.

ANALYSE VAN DE GEGEVENS

Bepaling van de EC_{50} en de IC_{50}

34. De EC_{50}-waarde (effectieve-concentratiemediaan van een teststof [agonisme]) en de IC_{50}-waarde (de concentratie van een teststof die 50 % remming veroorzaakt [antagonisme]) worden bepaald op basis van de concentratie-responsgegevens. Voor teststoffen die bij een of meer concentraties positief zijn, wordt de concentratie van de teststof die 50 % respons veroorzaakt, (IC_{50} of EC_{50}) berekend aan de hand van een Hill-functieanalyse of een geschikte alternatieve methode. De Hill-functie is een logistisch wiskundig model met vier parameters die het verband uitdrukt tussen de concentratie van de teststof en de respons (doorgaans in de vorm van een sigmoïdale curve) volgens de volgende vergelijking:

$$Y = Basis + \frac{(Top - Basis)}{1 + 10^{(lgEC_{50} - X)Hill - coëfficient}}$$

Waarbij:

Y = respons (d.w.z. RLU's);

X = de logaritme van de concentratie;

Basis = minimale respons;

Top = maximale respons;

lg EC_{50} (of lg IC_{50}) = de logaritme van X als de respons halverwege tussen de Top en de Basis;

Hill-coëfficiënt = helling van de curve.

Het model berekent de beste fit voor de parameters Top, Basis, Hill-coëfficiënt, IC_{50} en EC_{50}. Voor de berekening van de EC_{50} en de IC_{50} moet geschikte statistische software worden gebruikt (bv. Graphpad Prism^{R}).

Bepaling van uitschieters

35. Een goede statistische beoordeling zou kunnen worden bevorderd door (onder andere) de Q-test (zie agonisme- en antagonismeprotocollen (7) voor de bepaling van "onbruikbare" putjes die van de gegevensanalyse worden uitgesloten).

36. Voor de duplo's van de referentiestandaard E2 (steekproefgrootte twee) wordt elke gecorrigeerde ELU-waarde voor een duplo bij een bepaalde E2-concentratie als uitschieter

beschouwd als die meer dan 20 % afwijkt van de gecorrigeerde RLU-waarde voor die concentratie in de databank met historische gegevens.

Verzameling en correctie van luminometergegevens voor bereikbepaling

37. De ruwe gegevens van de luminometer moeten in een voor de bepaling bestemde spreadsheetsjabloon worden gezet. Vervolgens moet worden vastgesteld of er onder de gegevenspunten uitschieters zijn die verwijderd moeten worden. (Zie aanvaardbaarheidscriteria voor de parameters die in de analyses worden verkregen.) De volgende berekeningen moeten worden uitgevoerd:

Agonismebepaling

Stap 1 Bereken de gemiddelde waarde voor de DMSO-vehiculumcontrole (VC).
Stap 2 Trek de gemiddelde waarde voor de DMSO-VC af van de waarde voor elk putje om de gegevens te normaliseren.
Stap 3 Bereken de gemiddelde x-voudige inductie voor de referentiestandaard (E2).
Stap 4 Bereken de gemiddelde EC_{50}-waarde voor de teststoffen.

Antagonismebepaling

Stap 1 Bereken de gemiddelde waarde voor de DMSO-VC.
Stap 2 Trek de gemiddelde waarde voor de DMSO-VC af van de waarde voor elk putje om de gegevens te normaliseren.
Stap 3 Bereken de gemiddelde x-voudige remming voor de referentiestandaard (Ral/E2).
Stap 4 Bereken de gemiddelde waarde voor de referentiestandaard E2.
Stap 5 Bereken de gemiddelde IC_{50}-waarde voor de teststoffen.

Verzameling en correctie van luminometergegevens voor de integrale test

38. De ruwe gegevens van de luminometer moeten in een voor de bepaling bestemde spreadsheetsjabloon worden gezet. Vervolgens moet worden vastgesteld of er onder de gegevenspunten uitschieters zijn die verwijderd moeten worden. (Zie aanvaardbaarheidscriteria voor de parameters die in de analyses worden verkregen.) De volgende berekeningen worden uitgevoerd:

Agonismebepaling

Stap 1 Bereken de gemiddelde waarde voor de DMSO-VC.
Stap 2 Trek de gemiddelde waarde voor de DMSO-VC af van de waarde voor elk putje om de gegevens te normaliseren.
Stap 3 Bereken de gemiddelde x-voudige inductie voor de referentiestandaard (E2).
Stap 4 Bereken de gemiddelde EC_{50}-waarde voor E2 en de teststoffen.
Stap 5 Bereken de gemiddelde gecorrigeerde RLU-waarde voor methoxychloor.

Antagonismebepaling

Stap 1 Bereken de gemiddelde waarde voor de DMSO-VC.
Stap 2 Trek de gemiddelde waarde voor de DMSO-VC af van de waarde voor elk putje om de gegevens te normaliseren.
Stap 3 Bereken de gemiddelde x-voudige inductie voor de referentiestandaard (Ral/E2).
Stap 4 Bereken de gemiddelde IC_{50}-waarde voor Ral/E2 en de teststoffen.
Stap 5 Bereken de gemiddelde gecorrigeerde RLU-waarde voor tamoxifen.
Stap 6 Bereken de gemiddelde waarde voor de referentiestandaard E2.

Criteria voor gegevensinterpretatie

39. De VM7Luc-ER TA-bepaling is bedoeld als onderdeel van een benadering met meervoudige bewijsvoering ("weight of evidence"-benadering) als hulpmiddel bij de prioritering van stoffen voor het testen op hormoonverstorende effecten *in vivo*. Als onderdeel van deze prioriteringsprocedure wordt de teststof ingedeeld als positief of negatief voor ER-agonistische of ER-antagonistische activiteit. De beslissingscriteria voor positieve of negatieve resultaten die zijn gebruikt in de valideringsstudie voor de VM7Luc-ER TA-bepaling, worden beschreven in tabel 1.

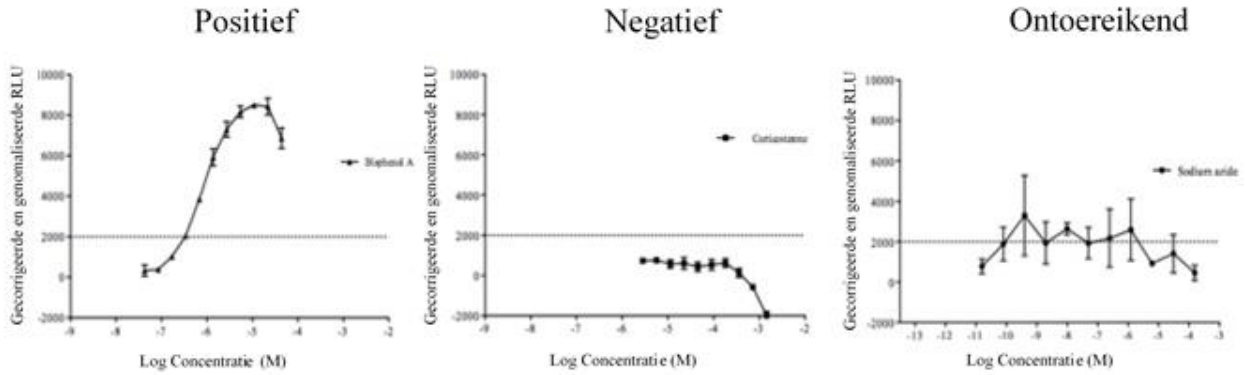
Tabel 1: Beslissingscriteria voor positieve en negatieve resultaten

AGONISTISCHE ACTIVITEIT	
Positief	- Alle teststoffen die als *positief* voor ER-agonistische activiteit worden ingedeeld, moeten een concentratie-responscurve hebben die bestaat uit een basislijn, gevolgd door een positieve helling en eindigend in een plateau of top. In sommige gevallen kunnen slechts twee van deze kenmerken (baseline-helling of helling-top) worden gedefinieerd. - De lijn die de positieve helling definieert, moet ten minste drie punten bevatten waarvan de foutbalken (gemiddelde ± SD) niet overlappen. De punten die de baseline vormen, worden hiervan uitgesloten, maar de top of het eerste punt van het plateau mag wel in het lineaire gedeelte van de curve worden meegenomen. - Een positieve indeling vereist een responsamplitude (het verschil tussen basislijn en top) van ten minste 20 % van de maximale waarde voor de referentiestandaard E2 (d.w.z. 2 000 RLU's of meer wanneer de maximale responswaarde van de referentiestandaard [E2] wordt gecorrigeerd naar 10 000 RLU's). - Zo mogelijk moet voor elke positieve teststof een EC_{50} worden berekend.
Negatief	De gemiddelde gecorrigeerde RLU voor een gegeven concentratie ligt op of onder de gemiddelde RLU-waarde voor de DMSO-controle plus driemaal de standaarddeviatie daarvan.

Ontoereikend	Gegevens die vanwege belangrijke kwalitatieve of kwantitatieve beperkingen niet als geldig kunnen worden geïnterpreteerd voor het vertonen van de aan- of afwezigheid van activiteit, worden beschouwd als ontoereikend en kunnen niet worden gebruikt om te bepalen of de teststof positief of negatief is. De betreffende chemische stoffen moeten opnieuw getest worden.
ANTAGONISTISCHE ACTIVITEIT	
Positief	- De gegevens over de teststof leveren een concentratie-responscurve op die bestaat uit een basislijn, gevolgd door een negatieve helling. - De lijn die de negatieve helling definieert, moet ten minste drie punten bevatten waarvan de foutbalken niet overlappen; de punten die de baseline vormen, worden hiervan uitgesloten, maar het eerste punt van het plateau mag wel in het lineaire gedeelte van de curve worden meegenomen. - Er moet sprake zijn van een afname in activiteit van minimaal 20 % ten opzichte van de maximale waarde voor de referentiestandaard Ral/E2 (d.w.z. 8 000 RLU's of minder wanneer de maximale responswaarde van de referentiestandaard [Ral/E2] wordt gecorrigeerd naar 10 000 RLU's). - De hoogste niet-toxische concentraties van de teststof moeten lager zijn dan of gelijk aan 1×10^{-5} M. - Zo mogelijk moet voor elke positieve teststof een IC_{50} worden berekend.
Negatief	Alle gegevenspunten liggen boven de ED_{80}-waarde (80 % van de respons voor E2 of 8 000 RLU's), op concentraties van minder dan $1{,}0 \times 10^{-5}$ M.
Ontoereikend	Gegevens die vanwege belangrijke kwalitatieve of kwantitatieve beperkingen niet als geldig kunnen worden geïnterpreteerd voor het vertonen van de aan- of afwezigheid van activiteit, worden beschouwd als ontoereikend en kunnen niet worden gebruikt om te bepalen of de teststof positief of negatief is. De betreffende chemische stof moet opnieuw getest worden.

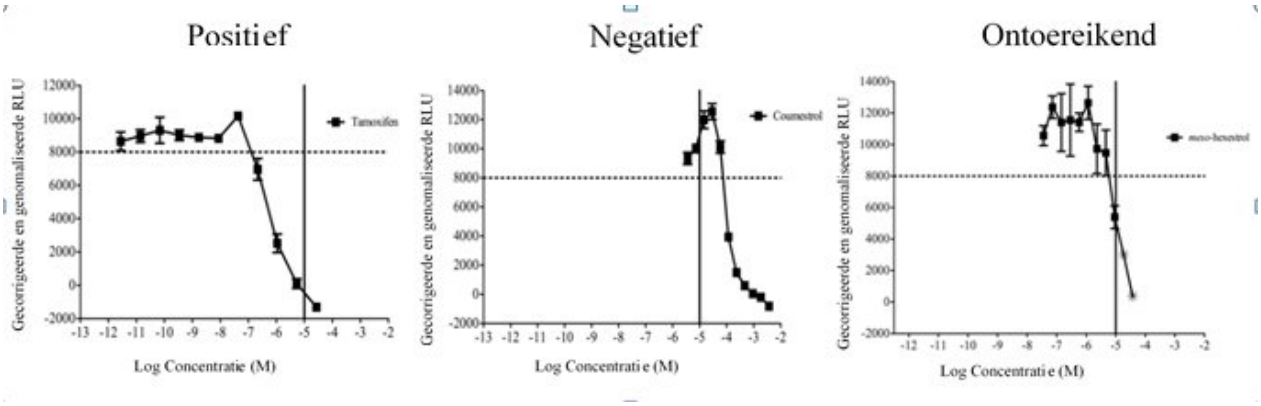
40. Positieve resultaten worden, voor zover mogelijk, gekarakteriseerd door zowel de grootte van het effect als de concentratie waarbij het effect optreedt. In figuur 5 en figuur 6 staan voorbeelden van positieve, negatieve en ontoereikende gegevens.

Figuur 5: Voorbeelden agonisme: positieve, negatieve en ontoereikende gegevens



De stippellijn geeft 20 % van de respons voor E2 aan, d.w.z. 2 000 gecorrigeerde en genormaliseerde RLU's.

Figuur 6: Voorbeelden antagonisme: positieve, negatieve en ontoereikende gegevens



De stippellijn geeft 80 % van de respons voor Ral/E2 aan, d.w.z. 8 000 gecorrigeerde en genormaliseerde RLU's.

De verticale lijn geeft $1{,}00 \times 10^{-5}$ M aan. Om als positief te worden beschouwd moet een respons bij concentraties van minder dan $1{,}00 \times 10^{-5}$ M onder de lijn voor 8 000 RLU's liggen.

In de grafiek voor *meso*-hexestrol staan de concentraties met een asterisk voor levensvatbaarheidsscores van "2" of hoger.

De testresultaten voor *meso*-hexestrol worden als ontoereikende gegevens beschouwd omdat de enige respons die onder de 8 000 RLU's ligt, optreedt bij $1{,}00 \times 10^{-5}$ M.

41. De EC_{50} en de IC_{50} kunnen worden berekend met behulp van een Hill-functie met vier parameters (zie voor meer bijzonderheden het agonismeprotocol en het antagonismeprotocol (7)). Als aan de aanvaardbaarheidscriteria wordt voldaan, betekent dit weliswaar dat het systeem naar behoren functioneert, maar wil dit nog niet zeggen dat een bepaalde testrun kloppende gegevens produceert. Duplicatie van de resultaten van de eerste testrun is de beste garantie dat de geproduceerde gegevens kloppen (zie punt 19 van "COMPONENTEN VAN DE ER TA-BEPALING".

TESTVERSLAG

Zie punt 20 van "COMPONENTEN VAN DE ER TA-BEPALING".

LITERATUUR

(1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, J. Cell Biochem., 82(3): 467-479.

(3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer Res., 58(23): 5367-5373.

(4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β, a Modulator of ERα in the Uterus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(11): 936-5941.

(5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), ALTEX, 23(Suppl): p. 270-273.

(6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Alternatives to Laboratory Animals, 33: p. 261-287.

(7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7850.

(8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals*, In Vitro* Mol. *Toxicol*.,13(1):67-82.

(9) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. *Pharmacol*., 71(10):1459-69.

(10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology,17(6):646-57.

(11) (11) Kuiper G.G, *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology,139(10):4252-63.

(12) Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(13) Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(14) Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(15) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors:development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenicand anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

AANHANGSEL 4

TRANSACTIVATIEBEPALING OP BASIS VAN STABIEL GETRANSFECTEERDE HUMANE OESTROGEENRECEPTOR-A VOOR HET OPSPOREN VAN OESTROGEENAGONISTISCHE EN -ANTAGONISTISCHE ACTIVITEIT VAN CHEMISCHE STOFFEN, WAARBIJ GEBRUIKGEMAAKT WORDT VAN DE CELLIJN ERA CALUX

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN (ZIE OOK ALGEMENE INLEIDING)

1. Voor de ERα CALUX-transactivatiebepaling wordt gebruikgemaakt van de humane cellijn U2OS voor het opsporen van oestrogeenagonistische en -antagonistische activiteit gemedieerd door de humane oestrogeenreceptor-alfa (hERα). In de valideringsstudie voor de stabiel getransfecteerde ERα CALUX-bioassay door BioDetection Systems BV (Amsterdam, Nederland) werden de relevantie en betrouwbaarheid van de bepaling voor het beoogde doel aangetoond (1). De cellijn ERα CALUX brengt enkel de stabiel getransfecteerde humane ERα tot expressie (2) (3).

2. Deze bepaling is speciaal ontworpen voor het opsporen van hERα-gemedieerde transactivatie door meting van bioluminescentie als eindpunt. In bioassays wordt veel gebruikgemaakt van bioluminescentie vanwege de hoge signaal-ruisverhouding (4).

3. Van fyto-oestrogeenconcentraties hoger dan 1 μM is echter overactivatie van het luciferasereportergen gerapporteerd, wat leidt tot niet-receptor-gemedieerde luminescentie (5) (6) (7). Bij transactivatiebepalingen op basis van stabiel getransfecteerde ER moeten hogere concentraties van fyto-oestrogenen of andere, vergelijkbare verbindingen die de expressie van luciferase kunnen overactiveren, dan ook zorgvuldig worden bestudeerd (zie aanhangsel 2).

4. Alvorens deze bepaling te gebruiken met het oog op regelgeving, moeten de "ALGEMENE INLEIDING" en "COMPONENTEN VAN DE ER TA-BEPALING" worden geraadpleegd. De in deze testmethode gebruikte definities en afkortingen staan in aanhangsel 1.

PRINCIPE VAN DE BEPALING (ZIE OOK DE ALGEMENE INLEIDING)

5. De bioassay wordt gebruikt voor het beoordelen van de ER-ligandbinding en de daarop volgende translocatie van het receptor-ligandcomplex naar de nucleus. In de nucleus bindt het receptor-ligandcomplex aan specifieke DNA-responselementen en transactiveert het een vuurvlieg-luciferasereportergen, wat leidt tot een verhoogde cellulaire expressie van het luciferase-enzym. Na toevoeging van luciferine, het substraat van luciferase, wordt dit

luciferine omgezet in een bioluminescent product. Het vrijkomende licht kan gemakkelijk worden gedetecteerd en gekwantificeerd met behulp van een luminometer.

6. In dit testsysteem worden stabiel getransfecteerde ERα CALUX-cellen gebruikt. ERα CALUX-cellen zijn afgeleid van de humane osteoblastische osteosarcoomcellijn U2OS. Humane U2OS-cellen werden stabiel getransfecteerd met 3xHRE-TATA-Luc en pSG5-neo-hERα volgens de calciumfosfaat-coprecipitatiemethode. De cellijn U2OS werd als beste keuze geselecteerd om als op oestrogenen (en andere steroïde hormonen) reagerende reportercellijn te dienen op basis van de waarneming dat de cellijn U2OS nauwelijks tot geen endogene receptoractiviteit vertoonde. Het ontbreken van endogene receptoren werd vastgesteld met alleen luciferasereporterplasmiden: na toevoeging van receptorliganden werd geen enkele activiteit waargenomen. Bovendien ondersteunde deze cellijn sterke hormoon-gemedieerde responsen bij tijdelijke introductie van verwante receptoren(2) (3) (8).

7. Voor het testen van chemische stoffen op oestrogene of anti-oestrogene activiteit met behulp van de cellijn ERα CALUX wordt eerst een screeningstestrun uitgevoerd, gevolgd door de integrale testruns. In de screeningstestrun worden de oplosbaarheid, de cytotoxiciteit en een beperkt concentratiebereik van de teststoffen bepaald ten behoeve van de integrale testruns. In de integrale tests worden de beperkte concentratiebereiken van de teststoffen getest in de ERα CALUX-bioassays, waarna de teststoffen worden ingedeeld op agonisme of antagonisme.

8. De criteria voor gegevensinterpretatie worden nader beschreven in punt 59. Samenvattend wordt een teststof als positief beoordeeld voor agonisme wanneer ten minste twee opeenvolgende concentraties van de teststof een respons opleveren die gelijk is aan of sterker dan 10 % van de maximale respons van de referentiestandaard 17β-oestradiol (PC_{10}). Een teststof wordt als positief beoordeeld voor antagonisme wanneer ten minste twee opeenvolgende concentraties van de teststof een respons opleveren die gelijk is aan of zwakker dan 80 % van de maximale respons van de referentiestandaard tamoxifen (PC_{80}).

PROCEDURE

Cellijnen

9. Voor de bepaling moet de stabiel getransfecteerde cellijn U2OS-ERα CALUX worden gebruikt. Deze cellijn is verkrijgbaar met een technische licentieovereenkomst bij Detection Systems BV, Amsterdam, Nederland.

10. Er mogen alleen mycoplasmavrije celculturen worden gebruikt. De gebruikte celpartijen moeten hetzij gecertificeerd negatief zijn voor verontreiniging met mycoplasma of er moet vóór gebruik een mycoplasmatest worden uitgevoerd. Voor een gevoelige detectie van

mycoplasma-infectie moet de methode PT-PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) worden gebruikt (9).

Stabiliteit van de cellijn

11. Om de stabiliteit en de integriteit van de CALUX-cellen te behouden, moeten de cellen worden bewaard in vloeibare stikstof (–80 °C). Nadat ze zijn ontdooid om een nieuwe kweek te beginnen, moeten de cellen ten minste tweemaal worden overgeënt alvorens te worden gebruikt ter beoordeling van de oestrogeenagonistische en -antagonistische activiteit van chemische stoffen. De cellen mogen niet meer dan 30 passages worden overgeënt.

12. Om de stabiliteit van de cellijn in de loop van de tijd te controleren moeten de responsiviteit van de agonistische en antagonistische testsystemen worden geverifieerd door de EC_{50} of IC_{50} van de referentiestandaard te beoordelen. Bovendien moet de relatieve inductie van de positieve controle (PC) en de negatieve controle (NC) worden gemonitord. De resultaten moeten overeenkomen met de aanvaardbaarheidscriteria voor de agonistische (tabel 3C) of antagonistische ERα CALUX-bioassay (tabel 4C). De referentiestandaarden, positieve controles en negatieve controles worden gegeven in tabel 1 voor agonisme en tabel 2 voor antagonisme.

Omstandigheden voor het kweken en uitplaten van de cellen

13. De U2OS-cellen moeten worden gekweekt in groeimedium (1:1 DMEM/F12-medium met fenolrood als pH-indicator, aangevuld met 7,5 % foetaal runderserum, 1 % niet-essentiële aminozuren, 10 eenheden/ml penicilline, streptomycine en geneticine (G-418) als selectiemarker. De cellen worden in een CO_2-incubator (5 % CO_2) geplaatst bij 37 °C en 100 % vochtigheid. Wanneer de cellen 85-95 % confluentie bereiken, moeten ze hetzij worden overgeënt, hetzij worden voorbereid om in mictotiterplaten met 96 putjes te worden geënt. In het tweede geval worden de cellen geresuspendeerd in een concentratie van 1×10^5 cellen/ml in oestrogeenvrij medium (1:1 DMEM/F12-medium zonder fenolrood, met met dextraan beklede kool behandeld foetaal runderserum (5 % v/v), niet-essentiële aminozuren (1 % v/v), 10 eenheden/ml penicilline en streptomycine) en uitgeplaat in de putjes van microtiterplaten met 96 putjes (100 µl gehomogeniseerde celsuspensie). Alvorens te worden blootgesteld worden de cellen 24 uur gepre-incubeerd in een CO_2-incubator (5 % CO_2, 37 °C, 100 % vochtigheid). Het kunststof laboratoriumgerei moet oestrogeenvrij zijn.

Aanvaardbaarheidscriteria

14. De agonistische activiteit en antagonistische activiteit van de teststof(fen) worden getest in testreeksen. Een testreeks bestaat uit maximaal 6 microtiterplaten. Elke testreeks omvat ten minste 1 volledige verdunningsreeks van een referentiestandaard, een positieve controle, een negatieve controle en oplosmiddelcontroles. In figuur 1 en figuur 2 wordt de plaatindeling weergegeven voor agonistische en antagonistische testreeksen.

15. Elke verdunning van de referentiestandaarden, teststoffen, alle oplosmiddelcontroles en de positieve en negatieve controles moeten in drievoud worden geanalyseerd. Elke drievoudige analyse moet aan de eisen in tabel 3A en tabel 4A voldoen.

16. In elke testreeks wordt in de eerste plaat een volledige verdunningsreeks van de referentiestandaard (17β-oestradiol voor agonisme; tamoxifen voor antagonisme) gemeten. Om te zorgen dat de analyseresultaten van de overige 5 microtiterplaten kunnen worden vergeleken met de eerste microtiterplaat, die de volledige concentratie-responscurve van de referentiestandaard bevat, moeten alle platen 3 controles bevatten: oplosmiddelcontrole, de hoogste geteste concentratie van de referentiestandaard en de concentratie van de referentiestandaard die de EC_{50} (agonisme) of de IC_{50} (antagonisme) benadert. De verhouding tussen de controlegemiddelden in de eerste plaat en de overige 5 platen moet aan de eisen in tabel 3C (agonisme) of tabel 4C (antagonisme) voldoen.

17. Voor elk van de microtiterplaten in een testreeks wordt de z-factor berekend (10). De z-factor moet worden berekend aan de hand van de responsen bij de hoogste en de laatste concentratie van de referentiestandaard. Een microtiterplaat wordt als valide beschouwd als hij aan de eisen in tabel 3C (agonisme) of tabel 4C (antagonisme) voldoet.

18. De referentiestandaard moet een sigmoïdale dosis-responscurve laten zien. De EC_{50} of IC_{50} die wordt afgeleid uit de respons van de verdunningsreeks van de referentiestandaard, moet aan de eisen in tabel 3C (agonisme) of tabel 4C (antagonisme) voldoen.

19. In elke testreeks moet een positieve en een negatieve controle worden opgenomen. De berekende relatieve inductie van zowel de positieve als de negatieve controle moet aan de eisen in tabel 3C (agonisme) of tabel 4C (antagonisme) voldoen.

20. Tijdens alle metingen moet de inductiefactor van de hoogste concentratie van de referentiestandaard worden gemeten door de gemiddelde hoogste respons voor de referentiestandaard 17β-oestradiol in relatieve lichteenheden (RLU) te delen door de gemiddelde RLU-respons voor de referentie-oplosmiddelcontrole. Deze inductiefactor moet voldoen aan de minimumeisen voor de x-voudige inductie in tabel 3C (agonisme) of tabel 4C (antagonisme).

21. Alleen microtiterplaten die aan alle bovengenoemde aanvaardbaarheidscriteria voldoen, worden als valide beschouwd en mogen worden gebruikt om de respons van de teststoffen te beoordelen.

22. De aanvaardbaarheidscriteria gelden voor zowel de screeningstest als de integrale testruns.

Tabel 1: Concentraties van de referentiestandaard, PC en NC voor de agonistische CALUX-bioassay

Stof	CAS RN	Testbereik (M)

Referentiestandaard	17β-oestradiol	50-28-2	$1,0 \times 10^{-13}$ - $1,0 \times 10^{-10}$
Positieve controle (PC)	17α-methyltestosteron	58-18-4	$3,0 \times 10^{-06}$
Negatieve controle (NC)	corticosteron	50-22-6	$1,0 \times 10^{-08}$

Tabel 2: Concentraties van de referentiestandaard, positieve controle (PC) en negatieve controle (NC) voor de antagonistische CALUX-bioassay

	Stof	**CAS RN**	**Testbereik (M)**
Referentiestandaard	tamoxifen	10540-29-1	$3,0 \times 10^{-09}$ - $1,0 \times 10^{-05}$
Positieve controle (PC)	4-hydroxytamoxifen	68047-06-3	1,010-09
Negatieve controle (NC)	resveratrol	501-36-0	1,010-05

Tabel 3: Aanvaardbaarheidscriteria voor de agonistische ERα CALUX bioassay

A – afzonderlijke monsters in een plaat		**Criterium**
1	Maximale %SD voor putjes in drievoud (voor NC, PC, elke verdunning van de teststof en de referentiestandaard, behalve C0)	< 15 %
2	Maximale %SD voor putjes in drievoud (voor referentiestandaard en controles met het oplosmiddel voor de teststof (C0, SC))	< 30 %
3	Maximale LDH-lekkage, als maat voor de cytotoxiciteit.	< 120 %
B – binnen een enkele microtiterplaat		
4	Verhouding tussen de controle met het oplosmiddel van de referentiestandaard (C0; plaat 1) en de controle met het oplosmiddel van	0,5 tot 2,0
5	Verhouding tussen de EC_{50} bij benadering en de hoogste concentraties van de referentiestandaard in plaat 1 enerzijds en de EC_{50} bij benadering en de hoogste concentraties van de referentiestandaard in plaat 2 tot x (C4, C8) anderzijds	0,70 tot 1,30
6	Z-factor voor elke plaat	> 0,6
C – binnen een afzonderlijke reeks analyses (alle platen in één reeks)		
7	Sigmoïdale curve van de referentiestandaard	Ja (17β-oestradiol)
8	EC_{50}-bereik referentiestandaard 17β-oestradiol	4×10^{-12} - 4×10^{-11} M

9	Minimale x-voudige inductie van de hoogste 17β-oestradiolconcentratie ten opzichte van de controle met het oplosmiddel van de referentiestandaard	5
10	Relatieve inductie (%) PC	> 30 %
11	Relatieve inductie (%) NC	< 10 %

PC: positieve controle; NC: negatieve controle; SC: controle met het oplosmiddel van de teststof; C0: controle met het oplosmiddel van de referentiestandaard; SD: standaarddeviatie; LDH: lactaatdehydrogenase

Tabel 4: Aanvaardbaarheidscriteria voor de antagonistische ERα CALUX bioassay

A – afzonderlijke monsters in een plaat		**Criterium**
1	Maximale %SD voor putjes in drievoud (voor NC, PC, elke verdunning van de teststof, de referentiestandaard, en de oplosmiddelcontrole (C0))	< 15 %
2	Maximale %SD van de putjes in drievoud (voor VC en hoogste concentratie van de referentiestandaard (C8))	< 30 %
3	Maximale LDH-lekkage, als maat voor de cytotoxiciteit.	< 120 %
B – binnen een enkele microtiterplaat		
4	Verhouding tussen de controle met het oplosmiddel van de referentiestandaard (C0; plaat 1) en de controle met het oplosmiddel van de teststof (SC; platen 2 tot x)	0,70 tot 1,30
5	Verhouding tussen de IC_{50} bij benadering van de referentiestandaard in plaat 1 en de IC_{50} bij benadering van de referentiestandaard in plaat 2 tot x (C4)	0,70 tot 1,30
6	Verhouding van de hoogste concentraties van de referentiestandaard in plaat 1 en de hoogste concentraties van de referentiestandaard in plaat 2 tot x (C8)	0,50 tot 2,0
7	Z-factor voor elke plaat	> 0,6
C – binnen een afzonderlijke reeks analyses (alle platen in één reeks)		
8	Sigmoïdale curve van de referentiestandaard	Ja (tamoxifen)
9	IC_{50}-bereik referentiestandaard (tamoxifen)	1×10^{-8} - 1×10^{-7} M
10	Minimale x-voudige inductie van de controle met het oplosmiddel van de referentiestandaard ten opzichte van de hoogste concentratie tamoxifen.	2,5

11	Relatieve inductie (%) PC	< 70 %
12	Relatieve inductie (%) NC	> 85 %

PC: positieve controle; NC: negatieve controle; VC: vehiculumcontrole (oplosmiddelcontrole zonder vaste concentratie van de agonistische referentiestandaard); SC: controle met het oplosmiddel van de teststof; C0: controle met het oplosmiddel van de referentiestandaard; SD: standaarddeviatie; LDH: lactaatdehydrogenase

Oplosmiddel-/vehiculumcontrole, referentiestandaarden, positieve controles, negatieve controles

23. Voor de screeningstestrun en de integrale testruns moeten dezelfde oplosmiddel-/vehiculumcontrole, referentiestandaarden, positieve controles en negatieve controles worden gebruikt. Bovendien moet de concentratie van de referentiestandaarden, positieve controles en negatieve controles gelijk zijn.

Oplosmiddelcontrole

24. Het oplosmiddel dat wordt gebruikt voor het oplossen van de teststoffen moet worden getest als oplosmiddelcontrole. Tijdens de validatie van de ERα CALUX-bioassay werd dimethylsulfoxide (DMSO, 1 % (v/v); CAS RN 67-68-5) als vehiculum gebruikt. Als een ander oplosmiddel dan DMSO wordt gebruikt, moeten alle referentiestandaarden, controles en teststoffen in hetzelfde vehiculum worden getest. Er zij op gewezen dat de oplosmiddelcontrole voor antagonisme-onderzoeken een vaste concentratie van de agonistische referentiestandaard 17β-oestradiol (bij benadering de EC_{50}-concentratie) bevat. Om het oplosmiddel voor antagonisme-onderzoeken te testen moet een vehiculumcontrole worden opgezet en getest.

Vehiculumcontrole (antagonisme)

25. Voor antagonismebepalingen wordt aan het testmedium een vaste concentratie van de agonistische referentiestandaard 17β-oestradiol (bij benadering de EC_{50}-concentratie) toegevoegd. Om het oplosmiddel dat wordt gebruikt voor het oplossen van de teststoffen in een antagonismebepaling te testen, moet een testmedium zonder vaste concentratie van de agonistische referentiestandaard 17β-oestradiol worden bereid. Deze controle wordt aangeduid als de vehiculumcontrole. Tijdens de validatie van de ERα CALUX-bioassay werd dimethylsulfoxide (DMSO, 1 % (v/v); CAS RN 67-68-5) als vehiculum gebruikt. Als een ander oplosmiddel dan DMSO wordt gebruikt, moeten alle referentiestandaarden, controles en teststoffen in hetzelfde vehiculum worden getest.

Referentienormen

26. De referentiestandaard voor de agonismebepaling is 17β-oestradiol (tabel 1). De referentiestandaarden bestaan uit een verdunningsreeks van acht concentraties 17β-oestradiol ($1{,}0 \times 10^{-13}$, $3{,}0 \times 10^{-13}$, $1{,}0 \times 10^{-12}$, $3{,}0 \times 10^{-12}$, $6{,}0 \times 10^{-12}$, $1{,}0 \times 10^{-11}$, $3{,}0 \times 10^{-11}$, $1{,}0 \times 10^{-10}$ M).

27. De referentiestandaard voor de antagonismebepaling is tamoxifen (tabel 2). De referentiestandaarden bestaan uit een verdunningsreeks van acht concentraties tamoxifen ($3{,}0 \times 10^{-09}$, $1{,}0 \times 10^{-08}$, $3{,}0 \times 10^{-08}$, $1{,}0 \times 10^{-07}$, $3{,}0 \times 10^{-07}$, $1{,}0 \times 10^{-06}$, $3{,}0 \times 10^{-06}$, $1{,}0 \times 10^{-05}$ M). Elke concentratie van de antagonistische referentiestandaard moet geco-incubeerd worden met een vaste concentratie van de agonistische referentiestandaard 17β-oestradiol ($3{,}0 \times 10^{-12}$ M).

Positieve controle

28. De positieve controle voor agonisme-onderzoeken is 17α-methyltestosteron (tabel 1).

29. De positieve controle voor antagonisme-onderzoeken is 4-hydroxytamoxifen (tabel 2). De antagonistische positieve controle moet geco-incubeerd worden met een vaste concentratie van de agonistische referentiestandaard 17β-oestradiol ($3{,}0 \times 10^{-12}$ M).

Negatieve controle

30. De negatieve controle voor agonisme-onderzoeken is corticosteron (tabel 1).

31. De negatieve controle voor antagonisme-onderzoeken is resveratrol (tabel 2). De antagonistische negatieve controle moet geco-incubeerd worden met een vaste concentratie van de agonistische referentiestandaard 17β-oestradiol ($3{,}0 \times 10^{-12}$ M).

Aantoning van de bekwaamheid van laboratoria (zie punt 14 en de tabellen 3 en 4 onder "COMPONENTEN VAN DE ER TA-BEPALING" van deze testmethode)

Vehiculum

32. Het oplosmiddel dat wordt gebruikt om de teststof op te lossen, moet de teststof volledig oplosbaar maken en moet mengbaar zijn met het celmedium. Geschikte oplosmiddelen zijn DMSO, water en ethanol (95 % tot 100 % zuiverheid). Bij gebruik van DMSO als oplosmiddel mag de maximale DMSO-concentratie tijdens de incubatie niet hoger zijn dan 1 % (v/v). Het oplosmiddel moet vóór gebruik getest worden op afwezigheid van cytotoxiciteit en interferentie met de prestaties van de bepaling.

Bereiding van de referentiestandaarden, positieve controles, negatieve controles en teststoffen

33. Referentiestandaarden, positieve controles, negatieve controles en teststoffen worden opgelost in 100 % DMSO (of een geschikt oplosmiddel). Vervolgens moeten in hetzelfde oplosmiddel passende (seriële) verdunningen worden bereid. Alvorens te worden opgelost moeten alle stoffen de gelegenheid krijgen om te equilibreren op kamertemperatuur. In de vers bereide stamoplossingen van de referentiestandaarden, positieve controles, negatieve controles en teststoffen mag geen neerslag of troebelheid zichtbaar zijn. Stamoplossingen van referentiestandaarden en controles mogen in bulk worden bereid. Stamoplossingen van teststoffen moeten voor elk experiment vers worden bereid. De eindverdunningen van de referentiestandaarden, positieve controles, negatieve controles en teststoffen moeten voor elk experiment vers worden bereid en binnen 24 uur na bereiding worden gebruikt.

Oplosbaarheid, cytotoxiciteit en bereikbepaling

34. De oplosbaarheid van de teststoffen in het gekozen oplosmiddel wordt bepaald tijdens de screeningstestrun. Er wordt een stamoplossing bereid met een maximale concentratie van 0,1 M. Als deze concentratie oplosbaarheidsproblemen vertoont, moeten stamoplossingen

met lagere concentraties worden bereid totdat de teststoffen volledig oplosbaar zijn. Tijdens de screeningstestrun worden 1:10-verdunningsreeksen van de teststof getest. De maximale concentratie voor de agonisme- en antagonismebepalingen is 1 mM. Uit de screening wordt een passend, beperkt concentratiebereik voor de teststoffen afgeleid dat tijdens de integrale testruns moet worden getest. Voor de integrale testruns moeten de volgende verdunningen worden gebruikt: 1 x, 3 x, 10 x, 30 x, 100 x, 300 x, 1 000 x en 3 000 x.

35. Het testen op cytotoxiciteit is opgenomen in het protocol voor de agonisme- en de antagonismebepaling (11). Deze tests op cytotoxiciteit zijn zowel in de screeningstestrun als in de integrale testruns opgenomen. Bij de validering van de ERα CALUX-bioassay werd de cytotoxiciteit beoordeeld aan de hand van de lactaatdehydrogenase-lekkagetest (LDH-lekkagetest) in combinatie met kwalitatieve visuele inspectie van de cellen (zie aanhangsel 4.1) na blootstelling aan de teststoffen. Er mogen evenwel ook andere kwantitatieve methoden worden gebruikt ter bepaling van de cytotoxiciteit (bv. colorimetrische test op basis van tetrazol (MTT) of CALUX-cytotoxiciteitsbioassay). In het algemeen worden teststofconcentraties die de cellevensvatbaarheid met meer dan 20 % doen afnemen, als cytotoxisch beschouwd, zodat ze niet kunnen worden gebruikt bij de evaluatie van de gegevens. Wat betreft de LDH-lekkagetest wordt de concentratie van de teststof als cytotoxisch beschouwd wanneer het percentage LDH-lekkage hoger is dan 120 %.

Blootstelling aan de teststof en indeling van de testplaat

36. Nadat een confluente kweekfles met gekweekte cellen is behandeld met trypsine, worden de cellen in een concentratie van 1×10^5 cellen/ml geresuspendeerd in oestrogeenvrij testmedium. 100 µl geresuspendeerde cellen wordt uitgeplaat in de binnenste putjes van een microtiterplaat met 96 putjes. De buitenste putjes worden gevuld met 200 µl fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS) (zie de figuren 1 en 2). De uitgeplate cellen worden 24 uur gepre-incubeerd in een CO_2-incubator (5 % CO_2, 37 °C, 100 % vochtigheid).

37. Na de pre-incubatie worden de platen geïnspecteerd op zichtbare cytotoxiciteit (zie aanhangsel 4.1), verontreiniging en confluentie. Voor de bepaling worden alleen platen zonder zichtbare cytotoxiciteit of verontreiniging en met minimaal 85 % confluentie gebruikt. Uit de binnenste putjes wordt het medium zorgvuldig verwijderd en vervangen door 200 µl oestrogeenvrij testmedium met een passende verdunningsreeks van referentiestandaarden, teststoffen, positieve controles, negatieve controles en oplosmiddelcontroles (tabel 5: agonisme-onderzoeken; tabel 6: antagonisme-onderzoeken). Alle referentiestandaarden, teststoffen, positieve controles, negatieve controles en oplosmiddelcontroles worden in drievoud getest. In figuur 1 wordt de indeling van de plaat voor de agonismebepaling weergegeven. In figuur 2 wordt de indeling van de plaat voor de antagonismebepaling weergegeven. Voor screeningstests en integrale tests wordt dezelfde plaatindeling gebruikt. Voor antagonismebepalingen bevatten alle binnenste putjes behalve die voor de vehiculumcontrole (VC) ook een vaste concentratie van de agonistische

referentiestandaard 17β-oestradiol ($3{,}0 \times 10^{-12}$ M). Er zij op gewezen dat aan elke plaat die de teststof bevat, de referentiestandaarden C8 en C4 moeten worden toegevoegd.

38. Nadat de cellen aan alle chemische stoffen zijn blootgesteld, worden de 96-putjesplaten nog eens 24 uur in een CO_2-incubator (5 % CO_2, 37 °C, 100 % vochtigheid) geïncubeerd.

Figuur 1: Indeling van de microtiterplaten met 96 putjes voor de screening en de beoordeling van agonistische effecten.

Plaat 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Volgende platen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC_{50})	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC_{50})	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC_{50})	
H												

C0 = oplosmiddel van de referentiestandaard.

C(1-8) = verdunningsreeks (1-8, lage tot hoge concentraties) van de referentiestandaard.

PC = positieve controle.

NC = negatieve controle.

TCx-(1-8) = verdunningen (1-8, lage tot hoge concentraties) van de teststof voor de screeningstestrun en de beoordeling van de agonistische effecten van de teststof x.

SC = controle met het oplosmiddel van de teststof (bij voorkeur hetzelfde oplosmiddel als in C0, maar eventueel van een andere batch).

Grijze cellen: = Buitenste putjes, gevuld met 200 µl PBS.

Figuur 2: Indeling van de microtiterplaten met 96 putjes voor de screening en de beoordeling van antagonistische effecten.

Plaat 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Volgende platen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC_{50})	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC_{50})	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC_{50})	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = oplosmiddel van de referentiestandaard.

C(1-8) = verdunningsreeks (1-8, lage tot hoge concentraties) van de referentiestandaard.

NC = negatieve controle.

PC = positieve controle.

TCx-(1-8) = verdunningen (1-8, lage tot hoge concentraties) van de teststof voor de screeningstestrun en de beoordeling van de agonistische effecten van de teststof x.

SC = controle met het oplosmiddel van de teststof (bij voorkeur hetzelfde oplosmiddel als in C0, maar eventueel van een andere batch).

VC = vehiculumcontrole (oplosmiddelcontrole zonder vaste concentratie van de agonistische referentiestandaard 17β-oestradiol).

Grijze cellen: = Buitenste putjes, gevuld met 200 µl PBS.

Opmerking: alle binnenste putjes, behalve die voor de vehiculumcontrole (VC), bevatten ook een vaste concentratie van de agonistische referentiestandaard 17β-oestradiol ($3{,}0 \times 10^{-12}$ M).

Meting van de luminescentie

39. Het meten van de luminescentie wordt uitvoerig beschreven in het protocol voor de agonisme- en antagonismebepaling (10). Het medium moet uit de putjes worden verwijderd en de cellen moet worden gelyseerd na 24 uur incubatie om de celmembraan te openen en meting van de luciferaseactiviteit mogelijk te maken.

40. Voor de procedure voor het meten van de luminescentie is een luminometer nodig met 2 injectoren. De luciferasereactie wordt gestart door het substraat luciferine te injecteren. De reactie wordt gestopt door 0,2 M NaOH toe te voegen. De reactie wordt gestopt om te voorkomen dat de luminescentie van het ene putje op het andere overgaat.

41. De lichtemissie uit elk putje wordt uitgedrukt als relatieve lichteenheden (RLU) per putje.

Screeningstestrun

42. De analyseresultaten van de screening worden gebruikt om een beperkt concentratiebereik van de teststoffen vast te stellen voor de integrale tests. Hoe de analyseresultaten van de screening worden beoordeeld en hoe het beperkte concentratiebereik voor de integrale tests wordt bepaald, wordt uitvoerig beschreven in het protocol voor de agonisme- en antagonismebepaling (10). Hier wordt een beknopte samenvatting gegeven van de procedures voor het bepalen van het concentratiebereik van de teststoffen voor de agonisme- en antagonismebepaling. Zie de tabellen 5 en 6 voor richtsnoeren voor het vaststellen van de verdunningsreeksen.

Selectie van de concentraties voor de beoordeling van agonistische effecten

43. In de screeningstestrun moeten de teststoffen worden getest in een verdunningsreeksen zoals aangegeven in tabel 5 (agonisme) en tabel 6 (antagonisme). Alle concentraties worden in drievoudige putjes getest volgens de plaatindeling die wordt weergegeven in figuur 1 (agonisme) of 2 (antagonisme).

44. Alleen analyseresultaten die aan de aanvaardbaarheidscriteria (tabel 3) voldoen, worden als valide beschouwd en mogen worden gebruikt om de respons van de teststoffen te beoordelen. Als een of meer microtiterplaten in een analyseserie niet aan de aanvaardbaarheidscriteria voldoen, moeten de betreffende microtiterplaten opnieuw worden geanalyseerd. Indien de eerste plaat met de volledige verdunningsreeks van de referentiestandaard niet aan de aanvaardbaarheidscriteria voldoet, moet de volledige testreeks (6 platen) opnieuw worden geanalyseerd.

45. De initiële concentratiebereiken van de teststoffen moeten worden aangepast en de screeningstest moet worden herhaald indien:

- er cytotoxiciteit wordt waargenomen. De screeningsprocedure moet worden herhaald met lagere, niet-cytotoxische concentraties van de teststof;
- de screening van de teststof geen volledige dosis-responscurve oplevert, omdat de geteste concentraties maximale inductie vertonen. De screeningstestrun moet worden herhaald met lagere concentraties van de teststof.

46. Wanneer er een valide verband tussen dosis en respons wordt waargenomen, moet de (laagste) concentratie worden geselecteerd waarbij maximale inductie wordt waargenomen en die geen cytotoxiciteit vertoont. De hoogste concentratie van de teststof die in de integrale testruns getest wordt, moet driemaal zo hoog zijn als deze geselecteerde concentratie.

47. Beginnend met de hoogste concentratie zoals hierboven vastgesteld wordt er een volledige, beperkte verdunningsreeks van de teststof bereid met verdunningsstappen zoals aangegeven in tabel 5.

48. Een teststof die geen enkel agonistisch effect vertoont, moet in de integrale testruns worden getest vanaf de hoogste, niet-cytotoxische concentratie die in de screening werd vastgesteld.

Selectie van de concentraties voor de beoordeling van antagonistische effecten

49. Alleen analyseresultaten die aan de aanvaardbaarheidscriteria (tabel 4) voldoen, worden als valide beschouwd en mogen worden gebruikt om de respons van de teststoffen te beoordelen. Als een of meer microtiterplaten in een analyseserie niet aan de aanvaardbaarheidscriteria voldoen, moeten de betreffende microtiterplaten opnieuw worden geanalyseerd. Indien de eerste plaat met de volledige verdunningsreeks van de referentiestandaard niet aan de aanvaardbaarheidscriteria voldoet, moet de volledige testreeks (6 platen) opnieuw worden geanalyseerd.

50. De initiële concentratiebereiken van de teststoffen moeten worden aangepast en de screeningstest moet worden herhaald indien:

- er cytotoxiciteit wordt waargenomen. De screeningsprocedure moet worden herhaald met lagere, niet-cytotoxische concentraties van de teststof;
- de screening van de teststof geen volledige dosis-responscurve oplevert, omdat de geteste concentraties maximale remming vertonen. De screening moet worden herhaald met lagere concentraties van de teststof.

51. Wanneer er een valide verband tussen dosis en respons wordt gevonden, moet de (laagste) concentratie worden geselecteerd waarbij maximale remming wordt waargenomen en die geen cytotoxiciteit vertoont. De hoogste concentratie van de teststof die in de integrale testruns getest wordt, moet driemaal zo hoog zijn als deze geselecteerde concentratie.

52. Beginnend met de hoogste concentratie zoals hierboven vastgesteld wordt er een volledige, beperkte verdunningsreeks van de teststof bereid met verdunningsstappen zoals aangegeven in tabel 6.

53. Teststoffen die geen enkel antagonistisch effect vertonen, moeten in de integrale testruns worden getest vanaf de hoogste, niet-cytotoxische concentratie die in de screening werd vastgesteld.

Integrale testruns

54. Wanneer de beperkte concentratiebereiken zijn geselecteerd, moeten de teststoffen integraal worden getest in een verdunningsreeksen zoals aangegeven in tabel 5 (agonisme) en tabel 6

(antagonisme). Alle concentraties worden in drievoudige putjes getest volgens de plaatindeling die wordt weergegeven in figuur 1 (agonisme) of 2 (antagonisme).

55. Alleen analyseresultaten die aan de aanvaardbaarheidscriteria (tabellen 3 en 4) voldoen, worden als valide beschouwd en mogen worden gebruikt om de respons van de teststoffen te beoordelen. Als een of meer microtiterplaten in een analyseserie niet aan de aanvaardbaarheidscriteria voldoen, moeten de betreffende microtiterplaten opnieuw worden geanalyseerd. Indien de eerste plaat met de volledige verdunningsreeks van de referentiestandaard niet aan de aanvaardbaarheidscriteria voldoet, moet de volledige testreeks (6 platen) opnieuw worden geanalyseerd.

Tabel 5: Concentraties en verdunningen van de referentiestandaarden, controles en teststoffen voor agonismebepalingen

Referentie 17β-oestradiol conc. (M)		**TCx - verdunning screeningstest**		**TCx - verdunning integrale test**		**Controles conc. (M)**	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$3{,}0 \times 10^{-06}$
C1	$1{,}0 \times 10^{-13}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1{,}0 \times 10^{-08}$
C2	$3{,}0 \times 10^{-13}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$1{,}0 \times 10^{-12}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$3{,}0 \times 10^{-12}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$6{,}0 \times 10^{-12}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1{,}0 \times 10^{-11}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3{,}0 \times 10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1{,}0 \times 10^{-10}$						

TCx - teststof x

PC - positieve controle (17α-methyltestosteron)

NC - negatieve controle (corticosteron)

C0 - controle met het oplosmiddel van de referentiestandaard

SC - controle met het oplosmiddel van de teststof

Tabel 6: Concentraties en verdunningen van de referentiestandaarden, controles en teststoffen voor antagonismebepalingen

Referentie tamoxifen conc. (M)		**TCx - verdunning screeningstest**		**TCx - verdunning integrale test**		**Controles conc. (M)**	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$1{,}0 \times 10^{-09}$
C1	$3{,}0 \times 10^{-09}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1{,}0 \times 10^{-05}$
C2	$1{,}0 \times 10^{-08}$	TCx-3	100.000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3{,}0 \times 10^{-08}$	TCx-4	10.000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1{,}0 \times 10^{-07}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3{,}0 \times 10^{-07}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Toegevoegde agonist conc. (M)**	
C6	$1{,}0 \times 10^{-06}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3{,}0 \times 10^{-06}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-oestradiol	$3{,}0 \times 10^{-12}$
C8	$1{,}0 \times 10^{-05}$						

TCx -teststof x

PC - positieve controle (4-hydroxytamoxifen)

NC - negatieve controle (resveratrol)

C0 - controle met het oplosmiddel van de referentiestandaard

SC - controle met het oplosmiddel van de teststof

VC - vehiculumcontrole (zonder vaste concentratie van de agonistische referentiestandaard 17β-oestradiol ($3{,}0 \times 10^{-12}$ M))

Verzameling en analyse van de gegevens

56. Na de screeningstestruns en de integrale testruns moeten voor een agonismebepaling de EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50} en de maximale inductie (TCx_{max}) van een teststof worden vastgesteld. Voor een antagonismebepaling moeten de IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50} en minimale inductie (TCx_{min}) worden berekend. Figuur 3 (agonisme) en figuur 4 (antagonisme) bevatten een grafische weergave van deze parameters. De benodigde parameters worden berekend op basis van de relatieve inductie van elke teststof (ten opzichte van de maximale inductie van de referentiestandaard (=100 %)). De gegevens moeten worden beoordeeld aan de hand van een niet-lineaire regressie (variabele helling, 4 parameters) volgens onderstaande vergelijking:

$$Y = Basis + \frac{(Top - Basis)}{(1 + 10^{((lgEC_{50} - X) * Hill-coëfficiënt)})}$$

Waarbij:

X = logaritme van de dosis of concentratie

Y = respons (relatieve inductie (%))

Top = maximale inductie (%)

Basis = minimale inductie (%)

$LogEC_{50}$ = logaritme van de concentratie waarbij 50 % van de maximale respons wordt waargenomen

Hill-coëfficiënt = helling van de Hill-curve

57. De ruwe gegevens van de luminometer, uitgedrukt in relatieve lichteenheden (RLU), moeten worden overgezet in de spreadsheet voor gegevensanalyse die is opgezet voor de screeningstestrun en de integrale testruns. De ruwe gegevens moeten voldoen aan de aanvaardbaarheidscriteria in de tabellen 3A en 3B (agonisme) of 4A en 4B (antagonisme). Wanneer de ruwe gegevens aan de aanvaardbaarheidscriteria voldoen, worden de volgende berekeningen uitgevoerd om de benodigde parameters te bepalen:

Agonisme

- Trek de gemiddelde RLU van de controle met het oplosmiddel van de referentiestandaard af van elk van de ruwe analysegegevens van de referentiestandaarden.

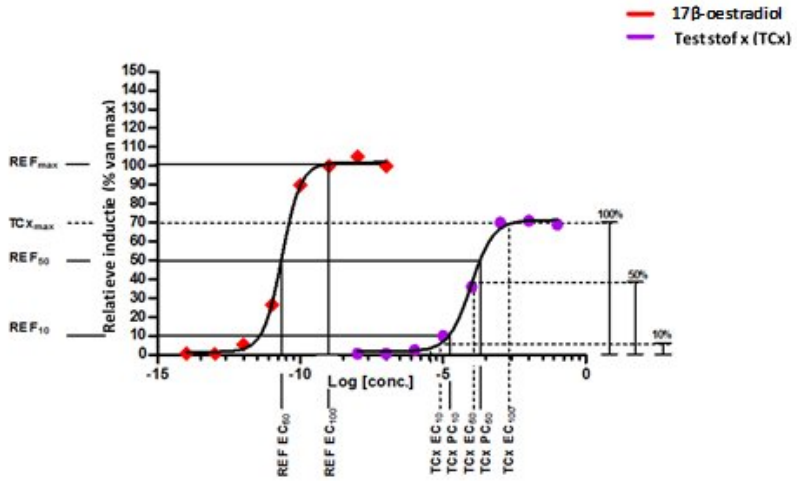
- Trek de gemiddelde RLU van de controle met het oplosmiddel van de teststof af van elk van de ruwe analysegegevens van de teststoffen.
- Bereken de relatieve inductie voor elke concentratie van de referentiestandaard. Stel de inductie van de hoogste concentratie van de referentiestandaard op 100 %.
- Bereken de relatieve inductie van elke concentratie van de teststof, waarbij 100 % overeenkomt met de hoogste concentratie van de referentiestandaard.
- Beoordeel de analyseresultaten aan de hand van niet-lineaire regressie (variabele helling, 4 parameters).
- Bepaal de EC_{50} en de EC_{10} van de referentiestandaard.
- Bepaal de EC_{50} en de EC_{10} van de teststoffen.
- Bepaal de maximale relatieve inductie van de teststof (TC_{max}).
- Bepaal de PC_{10} en de PC_{50} van de teststoffen.

Als gevolg van bv. cytotoxiciteit of oplosbaarheidsproblemen is het niet altijd mogelijk om een volledige dosis-responscurve voor teststoffen te verkrijgen. De EC_{50}, EC_{10} en PC_{50} kunnen dan niet worden bepaald. In dat geval kunnen alleen de PC_{10} en de TC_{max} worden bepaald.

Antagonisme

- Trek de gemiddelde RLU van de hoogste concentratie van de referentiestandaard af van elk van de ruwe analysegegevens van de referentiestandaarden.
- Trek de gemiddelde RLU van de hoogste concentratie van de referentiestandaard af van elk van de ruwe analysegegevens van de teststoffen.
- Bereken de relatieve inductie voor elke concentratie van de referentiestandaard. Stel de inductie van de laagste concentratie van de referentiestandaard op 100 %.
- Bereken de relatieve inductie van elke concentratie van de teststof, waarbij 100 % overeenkomt met de laagste concentratie van de referentiestandaard.
- Beoordeel de analyseresultaten aan de hand van niet-lineaire regressie (variabele helling, 4 parameters).
- Bepaal de IC_{50} en de IC_{20} van de referentiestandaard.
- Bepaal de IC_{50} en de IC_{20} van de teststoffen.
- Bepaal de minimale relatieve inductie van de teststof (TC_{min}).
- Bepaal de PC_{80} en de PC_{50} van de teststoffen.

Figuur 3: Overzicht van de parameters die worden bepaald in de agonismebepaling



EC_{10} = concentratie van een stof waarbij 10 % van de maximale respons van de stof wordt waargenomen.

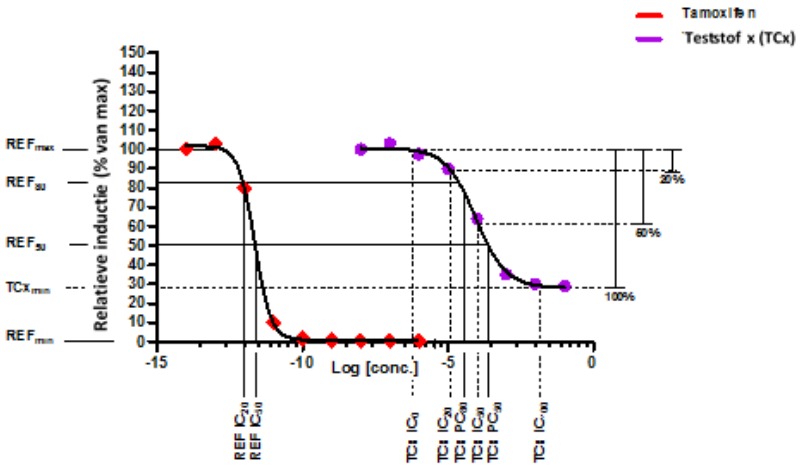
EC_{50} = concentratie van een stof waarbij 50 % van de maximale respons van de stof wordt waargenomen.

PC_{10} = concentratie van de teststof waarbij de respons gelijk is aan de EC10 van de referentiestandaard.

PC_{50} = concentratie van de teststof waarbij de respons gelijk is aan de EC50 van de referentiestandaard.

TCx_{max} = maximale relatieve inductie van de teststof.

Figuur 4: Overzicht van de parameters die worden bepaald in de antagonismebepaling



IC_{20} = concentratie van een stof waarbij 80 % van de maximale respons van de stof wordt waargenomen (20 % remming).

IC_{50} = concentratie van een stof waarbij 50 % van de maximale respons van de stof wordt waargenomen (50 % remming).

PC_{80} = concentratie van de teststof waarbij de respons gelijk is aan de IC^{20} van de referentiestandaard.

PC_{50} = concentratie van de teststof waarbij de respons gelijk is aan de IC^{50} van de referentiestandaard.

TCx_{min} = minimale relatieve inductie van de teststof.

Als gevolg van bv. cytotoxiciteit of oplosbaarheidsproblemen is het niet altijd mogelijk om een volledige dosis-responscurve voor teststoffen te verkrijgen. De IC_{50}, IC_{20} en PC_{50} kunnen dan niet worden bepaald. In dat geval kunnen alleen de PC_{20} en de TC_{min} worden bepaald.

58. De resultaten moeten op twee (of drie) onafhankelijke testruns worden gebaseerd. Als twee testruns vergelijkbare en dus reproduceerbare resultaten opleveren, is het niet nodig een derde testrun uit te voeren. Om aanvaardbaar te zijn moeten de resultaten:

- aan de aanvaardbaarheidscriteria voldoen (zie Aanvaardbaarheidscriteria, punten 14-22);
- reproduceerbaar zijn.

Criteria voor gegevensinterpretatie

59. Voor de interpretatie van de gegevens en de beslissing of een teststof als positief of negatief moet worden beschouwd, worden de volgende criteria gehanteerd:

Agonisme

Voor elke integrale testrun wordt een teststof als **positief** beschouwd indien:

1 de TC_{max} gelijk is aan of hoger is dan 10 % van de maximale respons van de referentiestandaard (REF_{10});

2 ten minste 2 opeenvolgende concentraties van de teststof gelijk zijn aan of hoger zijn dan de REF_{10}.

Voor elke integrale testrun wordt een teststof als **negatief** beschouwd indien:

1 de TC_{max} niet hoger is dan 10 % van de maximale respons van de referentiestandaard (REF_{10});

2 minder dan 2 concentraties van de teststof gelijk zijn aan of hoger zijn dan de REF_{10}.

Antagonisme

Voor elke integrale testrun wordt een teststof als **positief** beschouwd indien:

1 de TC_{min} gelijk is aan of lager is dan 80 % van de maximale respons van de referentiestandaard (REF_{80} = 20 % remming);

2 ten minste 2 opeenvolgende concentraties van de teststof gelijk zijn aan of lager zijn dan de REF_{80}.

Voor elke integrale testrun wordt een teststof als **negatief** beschouwd indien:

1 de TC_{min} hoger is dan 80 % van de maximale respons van de referentiestandaard (REF_{80} = 20 % remming);

2 minder dan 2 concentraties van de teststof gelijk zijn aan of lager zijn dan de REF_{80}.

60. Ter karakterisering van de potentie van de positieve respons van een teststof moeten de sterkte van het effect (agonisme: TC_{max}; antagonisme: TC_{min}) en de concentratie waarbij het effect zich voordoet (agonisme: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}; antagonisme: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}) in het verslag worden opgenomen.

TESTVERSLAG

61. Zie punt 20 van "COMPONENTEN VAN DE ER TA-BEPALING".

LITERATUUR

(1) OESO (2016). Draft Validation report of the (anti-) ERα CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136-148.

(3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, and van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER)α and not through ERβ. *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.

(4) Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology17(6):646-57.

(5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V and Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.

(6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

(7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.,* 122, 204–211.

(8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, and van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.,* 89(1), 173–187.

(9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M and Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma

contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.,* 57(4), 769-771.

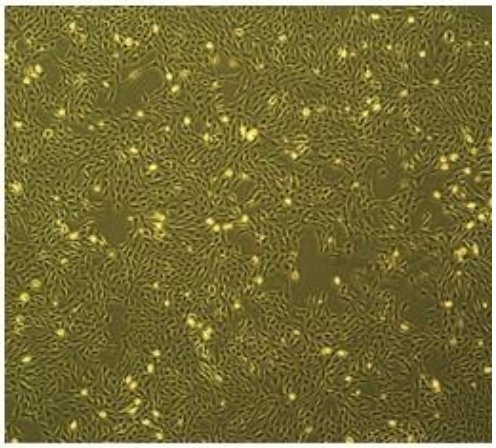
(10) Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays. J. Biomol. Scr., 4, 67-73

(11) Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, Nederland.

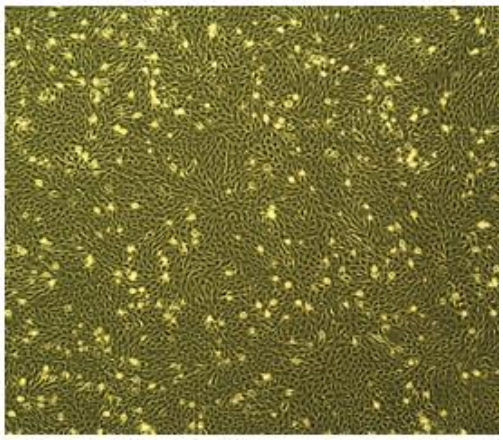
Aanhangsel 4.1: Visuele inspectie op cellevensvatbaarheid



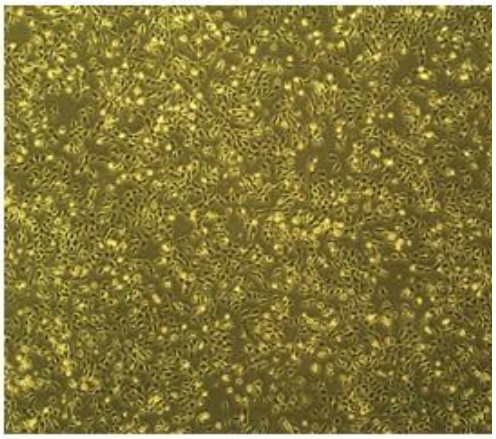
< 5 % confluentie. Cellen zijn pas geënt. 100 % cellevensvatbaarheid.
Classificatie: "geen cytotoxiciteit"



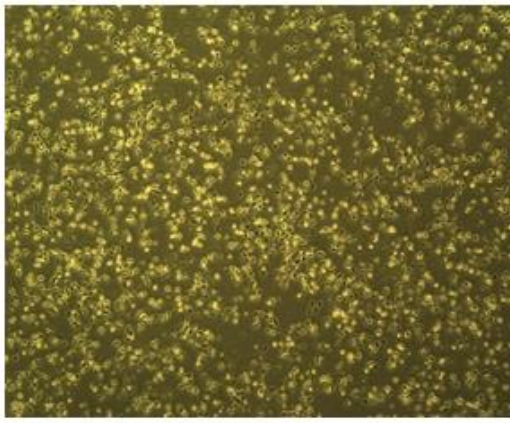
> 85 % confluentie. In dit stadium worden de cellen aan de teststoffen blootgesteld. > 95 % cellevensvatbaarheid.
Classificatie: "geen cytotoxiciteit"



> 95 % confluentie. Cellen zijn dicht opeengepakt en beginnen elkaar te overgroeien. > 95 % cellevensvatbaarheid.
Classificatie: "geen cytotoxiciteit"



< 25 % cellevensvatbaarheid. Cellen raken los van elkaar, het contact tussen de cellen neemt af. Cellen zijn rond van vorm.
Classificatie: "cytotoxiciteit"



< 5 % cellevensvatbaarheid. Cellen zijn helemaal los van elkaar en het contact tussen de cellen is verbroken. Cellen zijn rond van vorm. Classificatie: "cytotoxiciteit"

"B.67. IN-VITROGENMUTATIETESTS MET ZOOGDIERCELLEN AAN DE HAND VAN HET GEN VOOR THYMIDINEKINASE

INLEIDING

1. Deze testmethode (TM) is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 490 (2016) van de OESO. Testmethoden worden periodiek herzien in het licht van de wetenschappelijke vooruitgang, regelgevingsbehoeften en dierenwelzijn. De muizenlymfoombepaling (mouse lymphoma assay, MLA) en de TK6-test met de locus van thymidinekinase (TK) maakten oorspronkelijk deel uit van testmethode B.17. Sindsdien heeft de MLA-deskundigenwerkgroep van de International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT) internationaal geharmoniseerde aanbevelingen opgesteld voor aanvaardbaarheidscriteria en gegevensinterpretatie voor de MLA (1) (2) (3) (4) (5). Deze aanbevelingen worden verwerkt in deze nieuwe testmethode B.67. Deze testmethode is opgesteld voor de MLA, alsmede voor de TK6-test, omdat die ook gebruikmaakt van de TK-locus. Terwijl de MLA algemeen is gebruikt met het oog op regelgeving, is de TK6 vooralsnog veel minder toegepast. Er zij op gewezen dat de beide cellijnen ondanks de vergelijkbare eindpunten niet inwisselbaar zijn en dat regelgevingsprogramma's voor een bepaald regelgevingsdoel een gegronde voorkeur kunnen geven aan de ene boven de andere. Zo is bij de validering van de MLA aangetoond dat deze bepaling niet alleen geschikt is voor het detecteren van genmutaties, maar ook van het vermogen van een teststof om structurele chromosoombeschadigingen teweeg te brengen. Deze testmethode maakt deel uit van een reeks methoden om de genotoxiciteit te testen. De OESO heeft een document opgesteld met beknopte informatie over genetisch-toxicologische tests en een overzicht van de recente wijzigingen van de OESO-testrichtlijnen voor genetische toxiciteit (6).

2. De in-vitrogenmutatietests met zoogdiercellen zijn bedoeld voor de detectie van genmutaties die door chemische stoffen zijn geïnduceerd. In de cellijnen die in deze tests worden gebruikt, worden voorwaartse mutaties gemeten in reportergenen, met name het endogene gen voor thymidinekinase (*TK* in menselijke cellen en *Tk* in knaagdiercellen, in deze testmethode samen aangeduid als *TK*). Deze testmethode is bedoeld voor gebruik met twee cellijnen: de muizenlymfoomcellijn L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C (algemeen aangeduid als L5178Y) en de humane lymfoblastoïdcellijn TK6 (algemeen aangeduid als TK6). Hoewel de beide cellijnen verschillen in herkomst, celgroei, p53-status enz. kunnen de *TK*-genmutatietests met beide celtypen op vergelijkbare wijze worden uitgevoerd, zoals beschreven in deze testmethode.

3. Omdat het thymidinekinasegen een autosomaal, heterozygoot gen is, is het mogelijk om levensvatbare kolonies te detecteren waarvan de cellen deficiënt zijn in het enzym

thymidinekinase na mutatie van $TK^{+/-}$ naar $TK^{-/-}$. Deze deficiëntie kan het gevolg zijn van genetische gebeurtenissen die effect hebben op het *TK*-gen, waaronder genmutaties (puntmutaties, leesraammutaties, kleine deleties enz.) en chromosomale gebeurtenissen (grote deleties, chromosoomherschikkingen en mitotische recombinatie). Laatstgenoemde gebeurtenissen komen tot uiting als verlies van heterozygositeit, wat een vaak voorkomende genetische verandering is van tumorsuppressorgenen in de menselijke tumorigenese. Verlies van het volledige chromosoom waarop zich het *TK*-gen bevindt, als gevolg van verstoring van de spoelvorming en/of mitotische non-disjunctie, kan in theorie worden gedetecteerd in de MLA. Een combinatie van cytogene en moleculaire analyse laat inderdaad duidelijk zien dat bepaalde TK-mutanten in de MLA uit non-disjunctie voortkomen. De bewijskracht wijst evenwel uit dat *TK*-genmutatietests niet betrouwbaar zijn voor het detecteren van aneugenen wanneer de standaard cytotoxiciteitscriteria (zoals beschreven in deze testmethode) worden toegepast, en dat deze tests daarom niet geschikt zijn voor het detecteren van aneugenen (7) (8) (9).

4. In *TK*-genmutatietests worden twee onderscheiden fenotypen van *TK*-mutanten gegenereerd; normaal groeiende mutanten, die even snel groeien als heterozygote *TK*-cellen, en langzaam groeiende mutanten die groeien met langere verdubbelingstijden. Normaal groeiende en langzaam groeiende mutanten zijn herkenbaar als respectievelijk grote en kleine mutantkolonies in de MLA en vroeg verschijnende en laat verschijnende mutantkolonies in de TK6. Er is een gedetailleerde analyse gemaakt van de moleculaire en cytogenetische aard van zowel grote als kleine MLA-mutantkolonies (8) (10) (11) (12) (13). De moleculaire en cytogenetische aard van de vroeg verschijnende en laat verschijnende TK6-mutanten zijn eveneens uitvoerig onderzocht (14) (15) (16) (17). Langzaam groeiende mutanten voor beide celtypen hebben genetische beschadigingen opgelopen aan een of meer verondersteld groei-regulerende genen dichtbij de *TK*-locus, wat leidt tot langere verdubbelingstijden en de vorming van laat verschijnende of kleine kolonies (18). Er is een verband gelegd tussen langzaam groeiende mutanten en chemische stoffen die grootschalige structurele veranderingen op chromosoomniveau induceren. Cellen waarvan de beschadigingen geen invloed hebben op het/de verondersteld groei-regulerende gen(en) dichtbij de *TK*-locus, groeien in vergelijkbaar tempo als de oudercellen en worden normaal groeiende mutanten. De inductie van voornamelijk normaal groeiende mutanten wordt in verband gebracht met chemische stoffen die voornamelijk als puntmutagenen optreden. Het is dan ook essentieel om zowel langzaam groeiende als normaal groeiende mutanten te tellen, teneinde alle mutanten in aanmerking te nemen en enig inzicht te krijgen in het/de type(n) door de teststof veroorzaakte schade (mutagenen vs. clastogenen) (10) (12) (18) (19).

5. De testmethode in de testrichtlijn is zodanig opgezet dat deze algemene informatie verschaft die zowel voor de MLA als voor de TK6 geldt, evenals gespecialiseerde richtsnoeren voor de afzonderlijke tests.

6. Gebruikte definities worden gegeven in aanhangsel 1.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

7. Bij in vitro uitgevoerde tests moet er meestal een exogene metabole activeringsbron worden gebruikt. Het exogene metabole activeringssysteem kan de omstandigheden in vivo niet volledig nabootsen.

8. Er moet goed op worden gelet dat omstandigheden die zouden kunnen leiden tot artefactuele positieve resultaten (d.w.z. mogelijke interactie met het testsysteem), die niet het gevolg zijn van interactie tussen de teststof en het genetische materiaal van de cel, worden vermeden; zulke omstandigheden zijn onder andere veranderingen in de pH of de osmolaliteit, interactie met de bestanddelen van het medium (20) (21) of een te sterke cytotoxiciteit (22) (23) (24). Als de cytotoxiciteit de maximaal aanbevolen cytotoxiciteitsniveaus zoals omschreven in punt 28 overschrijdt, wordt deze als te sterk beschouwd voor de MLA en de TK6. Bovendien zij erop gewezen dat teststoffen die thymidine-analogen zijn of zich als thymidine-analogen gedragen, de mutantfrequentie kunnen verhogen door selectieve groei van de spontane achtergrondmutanten tijdens de behandeling van de cellen en dat het voor een adequate beoordeling van dergelijke stoffen nodig kan zijn om aanvullende testmethoden toe te passen (25).

9. Voor gefabriceerde nanomaterialen kunnen specifieke aanpassingen van deze testmethode noodzakelijk zijn, maar deze worden in deze testmethode niet beschreven.

10. Voordat de testmethode wordt gebruikt voor het testen van een mengsel om gegevens te genereren voor een beoogd regelgevingsdoel, moet worden nagegaan of, en zo ja, waarom deze methode betrouwbare resultaten oplevert voor dat doel. Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is.

11. Mutantcellen met een deficiëntie aan thymidinekinase-enzymactiviteit als gevolg van de mutatie van $TK^{+/-}$ naar $TK^{-/-}$ zijn resistent voor de cytostatische effecten van de pyrimidine-analoog trifluorthymidine (TFT). Cellen zonder deficiëntie aan *TK* zijn gevoelig voor TFT, waardoor het celmetabolisme wordt geremd en er geen celdeling meer plaatsvindt. Dit betekent dat mutantcellen zich in aanwezigheid van TFT wel kunnen voortplanten en zichtbare kolonies kunnen vormen, en cellen die het TK-enzym bevatten, niet.

PRINCIPE VAN DE TEST

12. Cellen in suspensie worden zowel met als zonder een exogene metabole activeringsbron (zie punt 19) gedurende een geschikte periode (zie punt 33) aan de teststof blootgesteld en vervolgens overgeënt om de cytotoxiciteit te bepalen en fenotypische expressie mogelijk te maken alvorens de mutanten te selecteren. Voor de MLA wordt de cytotoxiciteit bepaald aan de hand van de relatieve totale groei (RTG – zie punt 25), voor de TK6 aan de hand van de relatieve overleving (relative survival, RS – zie punt 26). De behandelde culturen blijven een voldoende lange periode, kenmerkend voor elk celtype (zie punt 37), in groeimedium om een vrijwel optimale fenotypische expressie van de geïnduceerde mutaties mogelijk te maken. Na fenotypische expressie wordt de mutantfrequentie bepaald door bekende aantallen cellen te enten in medium met de selecterende stof voor de detectie van mutantkolonies 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, gecorrigeerd voor de kloneringsefficiëntie op het moment van selecteren van de mutanten.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Voorbereidingen

Cellen

13. Voor de MLA: Voor de MLA moet de *TK*$^{+/-}$-3.7.2C sublijn van L5178Y-cellen worden gebruikt omdat deze specifieke sublijn ook is gebruikt bij de ontwikkeling en karakterisering van de MLA. De cellijn L5178Y is afgeleid van een door methylcholantreen geïnduceerd thymuslymfoom van een DBA-2-muis (26). Clive *et al.* behandelden L5178Y-cellen (door Clive TK$^{+/+}$-3 genoemd) met ethylmethaansulfonaat en isoleerden een TK$^{-/-}$-kloon (TK$^{-/-}$-3.7 genoemd) met broomdeoxyuridine als selecterende stof. Van de TK$^{-/-}$-kloon werden een spontane TK$^{+/-}$-kloon (TK$^{+/-}$-3.7.2. genoemd) en een subkloon (TK$^{+/-}$-3.7.2C genoemd) geïsoleerd en gekarakteriseerd voor gebruik in de MLA (27). Het karyotype voor de cellijn is gepubliceerd (28) (29) (30) (31). Het modale aantal chromosomen is 40. Er is één metacentrisch chromosoom (t12 13) dat als één chromosoom moet worden geteld. Bij de muis is de locus van *TK* gelegen op het distale uiteinde van chromosoom 11. De cellijn L5178Y *TK*$^{+/-}$-3.7.2C heeft mutaties in beide p53-allelen en produceert mutant-p53 eiwit (32) (33). Het is waarschijnlijk aan de p53-status van de cellijn TK$^{+/-}$-3.7.2C te danken dat de test grootschalige schade kan detecteren (17).

14. Voor de TK6: TK6 is een humane lymfoblastoïdcellijn. De oudercellijn is een door het Epstein-Barr-virus getransformeerde cellijn, WI-L2, die oorspronkelijk afkomstig

is van een mannelijke 5-jarige met hereditaire sferocytose. Door de eerste geïsoleerde kloon, HH4, te mutageniseren met ICR191 werd een *TK*-heterozygote cellijn, TK6, gegenereerd (34). TK6-cellen zijn bijna allemaal diploïde en het representatieve karyotype is 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Bij de mens is de locus van *TK* gelegen op de lange arm van chromosoom 17. TK6 is een p53-competente cellijn, omdat het een wildtype p53-sequentie heeft in beide allelen en alleen wildtype p53-eiwit tot expressie brengt (36).

15. Voor zowel de MLA als de TK6 wordt het testlaboratorium geadviseerd, wanneer het voor het eerst een mastervoorraad aanlegt of deze aanvult, zich ervan te vergewissen dat er geen sprake is van verontreiniging met *mycoplasma*, de cellen te karyotyperen of de chromosomen met de *TK*-locus te kleuren, en de populatieverdubbelingstijden te controleren. De normale tijd voor de celcyclus voor de in het testlaboratorium gebruikte cellen moet worden vastgesteld en moet overeenkomen met gepubliceerde celkenmerken (16) (19) (37). Deze mastervoorraad moet worden bewaard bij maximaal −150 ºC en moet worden gebruikt voor de bereiding van alle werk-celvoorraden.

16. Hetzij voorafgaand aan de bereiding van een groot aantal gecryopreserveerde werkvoorraden, hetzij vlak voor gebruik in een experiment is het wellicht nodig reeds aanwezige mutantcellen uit de cultuur te verwijderen (tenzij de mutantfrequentie (MF) van de oplosmiddelcontrole al binnen het aanvaardbare bereik ligt – zie tabel 2 voor de MLA). Hiertoe wordt methotrexaat (aminopterine) gebruikt om TK-deficiënte cellen uit te selecteren en worden thymidine, hypoxanthine en glycine (L5178Y) of 2'-deoxycytidine (TK6) aan de cultuur toegevoegd om een optimale groei van de TK-competente cellen te waarborgen (19) (38) (39), en (40) voor TK6). Algemene adviezen voor goede praktijken om celculturen in leven te houden en speciale adviezen voor L5178Y- en TK6-cellen zijn te vinden in (19) (31) (37) (39) (41). Voor laboratoria die voorraden mastercellen nodig hebben om de MLA of de TK6 op te zetten of om nieuwe voorraden mastercellen te verkrijgen, is een celbank met goed gekarakteriseerde cellen beschikbaar (37).

Media en kweekomstandigheden

17. Voor beide tests moet er worden gezorgd voor geschikte kweekmedia en incubatieomstandigheden voor de culturen (bv. kweekvaten, vochtige atmosfeer van 5 % CO_2, incubatietemperatuur van 37 °C). De celculturen moeten altijd onder zodanige omstandigheden worden gehouden dat ze in log-fase groeien. Het is vooral belangrijk dat de medium- en kweekomstandigheden zodanig worden gekozen dat de celgroei tijdens de expressieperiode en de klonering van zowel de mutantcellen als de gewone cellen optimaal zijn. Voor de MLA en de TK6 is het ook van belang dat de kweekomstandigheden zorgen voor een optimale groei van *TK*-mutanten die grote

kolonies vormen/vroeg verschijnen, als *TK*-mutanten die kleine kolonies vormen/laat verschijnen. Meer bijzonderheden over de kweek, waaronder de noodzaak om paardenserum goed te verwarmen om het te inactiveren indien bij de selectie van mutanten RPMI-medium wordt gebruikt, is te vinden in (19) (31) (38) (39) (40) (42).

Prepareren van de culturen

18. Cellen uit stamculturen worden met een zodanige dichtheid in een kweekmedium geënt dat de suspensieculturen tijdens de behandelingsperiode en de expressieperiode exponentieel zullen blijven groeien.

Metabole activering

19. Bij het gebruik van L5178Y- en TK6-cellen moeten exogene metabole activeringssystemen worden gehanteerd omdat ze onvoldoende endogene metabole capaciteit hebben. Het meest gebruikte systeem dat als standaard wordt aanbevolen, tenzij anders wordt gemotiveerd, is een post-mitochondriale fractie aangevuld met een cofactor (S9), verkregen uit de lever van knaagdieren (doorgaans ratten) die zijn behandeld met enzym-inducerende stoffen als Aroclor 1254 (43) (44) (45) of een combinatie van fenobarbiton en β-naftoflavon (46) (47) (48) (49) (50) (51). De laatste combinatie druist niet in tegen het Verdrag van Stockholm inzake persistente organische verontreinigende stoffen (52). Bovendien is aangetoond dat zij even effectief is als Aroclor 1254 voor de inducering van oxidasen met gemengde functie (45) (46) (47) (48) (49). De S9-fractie wordt meestal gebruikt bij een concentratie van 1-2 %, maar mag worden verhoogd tot 10 % (v/v) in het uiteindelijke testmedium. De keuze van het type en de concentratie van het exogene metabole activeringssysteem dat of de metabole inductor die wordt gebruikt, kan worden beïnvloed door de klasse van de teststoffen.

Teststofbereiding

20. Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen worden bereid en eventueel vóór de behandeling van de cellen worden verdund (zie punt 21). Vloeibare teststoffen kunnen direct aan het testsysteem worden toegevoegd en/of worden verdund vóór de behandeling van het testsysteem. Bij het testen van gassen of vluchtige teststoffen moeten geschikte aanpassingen van de standaardprotocollen worden gevolgd, zoals de behandeling in gesloten kweekvaten (53) (54) (55). Preparaten van de teststof moeten worden bereid vlak vóór de behandeling, tenzij met stabiliteitsgegevens is aangetoond dat bewaren van het preparaat aanvaardbaar is.

TESTOMSTANDIGHEDEN

Oplosmiddelen

21. Het oplosmiddel wordt zo gekozen dat het de oplosbaarheid van de te testen chemische stof vergroot zonder een negatieve invloed te hebben op het verloop van de test, bv. door veranderingen in de celgroei, aantasting van de integriteit van de teststof, reacties met kweekvaten, belemmering van het metabole activeringssysteem. Het wordt aanbevolen waar mogelijk eerst het gebruik van een waterig oplosmiddel (of kweekmedium) te overwegen. Gangbare oplosmiddelen zijn water of dimethylsulfoxide. Organische oplosmiddelen mogen in de regel de 1 % (v/v) en waterige oplosmiddelen (fysiologisch zout of water) de 10 % (v/v) in het uiteindelijke behandelingsmedium niet overschrijden. Als er andere dan de gangbare oplosmiddelen (bv. ethanol of aceton) worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze verenigbaar zijn met de teststoffen en het testsysteem en dat zij geen genetische toxiciteit vertonen in de gebruikte concentratie. Als die gegevens ontbreken, is het belangrijk ook onbehandelde controles toe te voegen (zie aanhangsel 1, Definities) om aan te tonen dat het gekozen oplosmiddel geen schadelijke of mutagene effecten induceert.

METING VAN CYTOTOXICITEIT EN KEUZE VAN BEHANDELINGSCONCENTRATIES

22. Bij de bepaling van de hoogste te testen concentratie van de teststof moeten concentraties worden vermeden die kunnen leiden tot artefactuele positieve reacties, zoals reacties die bovenmatige cytotoxiciteit (zie punt 28) voortbrengen, neerslag (zie punt 29) in het kweekmedium of uitgesproken wijzigingen in pH of osmolaliteit (zie punt 8). Indien de teststof op het ogenblik van toevoeging een uitgesproken wijziging in de pH van het medium veroorzaakt, kan de pH worden aangepast door het uiteindelijke behandelingsmedium te bufferen zodat artefactuele positieve reacties worden vermeden en passende kweekomstandigheden in stand worden gehouden.

23. De concentraties worden gekozen op basis van de cytotoxiciteit en andere overwegingen (zie punten 27-30). Hoewel de evaluatie van cytotoxiciteit in een eerste test nuttig kan zijn om de in het hoofdexperiment te gebruiken concentraties beter te kunnen vaststellen, is een eerste test niet vereist. Ook als er wel een voorevaluatie van cytotoxiciteit wordt uitgevoerd, moet in het hoofdexperiment nog steeds voor elke cultuur de cytotoxiciteit worden gemeten. Als er een bereikbepalingstest wordt uitgevoerd, moet deze een breed concentratiebereik bestrijken en kan deze hetzij worden beëindigd op dag 1 na de behandeling, of worden voortgezet tot en met de expressie op dag 2 en de selectie van de mutanten (als blijkt dat de gebruikte concentraties passend zijn).

24. Voor elke afzonderlijke testcultuur en controlecultuur moet de cytotoxiciteit worden vastgesteld: de te gebruiken methoden voor de MLA (2) en de TK6 (15) worden bepaald door de internationaal erkende praktijk.

25. Voor beide versies (agar en microtiterplaat) van de MLA: moet de cytotoxiciteit worden beoordeeld aan de hand van de relatieve totale groei (RTG), zoals oorspronkelijk gedefinieerd door Clive en Spector in 1975 (2). Deze maat voor de cytotoxiciteit omvat de relatieve suspensiegroei (RSG: testcultuur t.o.v. oplosmiddelcontrole) tijdens de behandeling van de cellen, de expressietijd en de relatieve kloneringsefficiëntie (RCE: testcultuur t.o.v. oplosmiddelcontrole) op het moment dat de mutanten worden geselecteerd (2). Er zij op gewezen dat in de RSG elk verlies van cellen in de testcultuur tijdens de behandeling in aanmerking wordt genomen (zie aanhangsel 2 voor de formules).

26. Voor de TK6: de cytotoxiciteit moet worden beoordeeld aan de hand van de relatieve overleving (RS), d.w.z. de kloneringsefficiëntie van onmiddellijk na de behandeling uitgeplate cellen, gecorrigeerd voor elk verlies van cellen gedurende de behandeling, op basis van het aantal cellen, vergeleken met de negatieve controle (waaraan een overleving van 100 % wordt toegekend) (zie aanhangsel 2 voor de formule).

27. Er moeten ten minste vier testconcentraties (exclusief het oplosmiddel en positieve controles) die voldoen aan de aanvaardbaarheidscriteria (passende mate van cytotoxiciteit, aantal cellen enz.), worden geëvalueerd. Hoewel het gebruik van duploculturen raadzaam is, kan bij elke geteste concentratie één behandelde cultuur worden gebruikt, maar ook duploculturen. De resultaten verkregen voor duploculturen bij een gegeven concentratie moeten afzonderlijk worden gerapporteerd, maar kunnen voor de gegevensanalyse worden gepoold (55). Voor teststoffen die weinig of geen cytotoxiciteit vertonen, zijn intervallen tussen de testconcentraties van ongeveer een factor 2 tot 3 doorgaans passend. Wanneer er cytotoxiciteit optreedt, moeten de concentraties een cytotoxiciteitsinterval bestrijken van een concentratie waarbij cytotoxiciteit optreedt zoals beschreven in punt 28, tot en met concentraties waarbij er matige en geen of vrijwel geen cytotoxiciteit is. Veel teststoffen vertonen een steile concentratie-responscurve, en om het hele cytotoxiciteitsbereik te bestrijken of in detail de concentratierespons te bestuderen zullen mogelijk dichter bij elkaar liggende concentraties en meer dan vier concentraties moeten worden gebruikt, in het bijzonder in situaties waarin een herhalingsexperiment vereist is (zie punt 70). Vooral bij gebruik van één cultuur kan het van belang zijn om meer dan vier concentraties te gebruiken.

28. Als de maximale concentratie is gebaseerd op cytotoxiciteit, moet voor de hoogste concentratie worden gestreefd naar een RTG tussen 20 en 10 % voor de MLA en een RS tussen 20 en 10 % voor de TK6 (punt 67).

29. Voor slecht oplosbare teststoffen die bij concentraties onder de oplosbaarheidsgrens niet cytotoxisch zijn, moet de hoogste geanalyseerde concentratie troebelheid of een met het oog of met behulp van een omgekeerde microscoop aan het eind van de

behandeling met de teststof zichtbaar neerslag opleveren. Zelfs indien cytotoxiciteit optreedt boven de oplosbaarheidsgrens, is het raadzaam de test uit te voeren bij slechts één concentratie die troebelheid of een zichtbaar neerslag oplevert, omdat het neerslag kan leiden tot artefactuele effecten. Omdat voor de MLA en de TK6 suspensieculturen worden gebruikt, moet er zorgvuldig op worden toegezien dat het neerslag de uitvoering van de test niet verstoort. Ook kan het nuttig zijn om voorafgaand aan het experiment de oplosbaarheid in het kweekmedium te bepalen.

30. Indien er geen neerslag of beperkende cytotoxiciteit wordt waargenomen, moet de hoogste testconcentratie overeenkomen met de laagste van de volgende waarden: 10 mM, 2 mg/ml of 2 µl/ml (57) (58). Wanneer de samenstelling van de teststof niet vastgesteld is, bv. in geval van een stof van onbekende of variabele samenstelling, complexe reactieproducten of biologisch materiaal (d.w.z. Chemical Substances of Unknown or Variable Composition of UVCB's), milieu-extracten enz., moet de hoogste concentratie bij het ontbreken van voldoende cytotoxiciteit mogelijk hoger zijn (bv. 5 mg/ml) om de concentratie van elk van de componenten te verhogen. Er zij echter opgemerkt dat deze eisen voor geneesmiddelen voor menselijk gebruik anders kunnen zijn (59).

Controles

31. Voor elk experimentele omstandigheid dienen gelijktijdige negatieve controles (zie punt 21) in het experiment te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel wordt toegediend en die verder op dezelfde manier worden behandeld als de culturen met teststof.

32. Gelijktijdige positieve controles zijn nodig om aan te tonen dat het laboratorium in staat is om mutagenen te identificeren onder de omstandigheden van het gebruikte testprotocol, dat het exogene metabole activeringssysteem doeltreffend is (indien van toepassing) en dat zowel *TK*-mutanten die kleine kolonies vormen/laat verschijnen, als *TK*-mutanten die grote kolonies vormen/vroeg verschijnen adequaat gedetecteerd worden. Voorbeelden van voor positieve controle gebruikte chemische stoffen worden gegeven in tabel 1 hieronder. Er kunnen ook alternatieve positieve controlestoffen worden gebruikt, indien dat wordt gemotiveerd. Omdat in-vitrogenotoxiciteitstests op zoogdiercellen voldoende gestandaardiseerd zijn voor korte behandelingen (3-4 uur) die gelijktijdig met en zonder metabole activering met dezelfde behandelingsduur worden toegepast, kan het gebruik van positieve controles worden beperkt tot een mutageen dat metabole activering nodig heeft. In dat geval zal deze ene positievecontrolerespons zowel de activiteit van het metabole activeringssysteem als de gevoeligheid van het testsysteem aantonen. Indien toegepast, moet een langlopende behandeling (d.w.z. 24 uur zonder S9) echter haar eigen positieve controle hebben, omdat de behandelingsduur zal afwijken van de test waarbij metabole activering

wordt toegepast. Elke positieve controle moet worden gebruikt bij een of meer concentraties waarvoor een reproduceerbare en detecteerbare stijging ten opzichte van het achtergrondniveau kan worden verwacht, om de gevoeligheid van het testsysteem aan te tonen, en de respons mag niet in het gedrang komen door een mate van cytotoxiciteit die de in deze TM gespecificeerde grenzen overschrijdt (zie punt 28).

Tabel 1: Aanbevolen referentiestoffen voor het beoordelen van de bekwaamheid van laboratoria en voor het selecteren van positieve controles

Categorie	Stof	CAS RN
1. Mutagenen werkzaam zonder metabolische activering		
Methylmethaansulfonaat	66-27-3	
Mitomycine C	50-07-7	
4-Nitrochinoline-*N*-oxide	56-57-5	
2. Mutagenen waarvoor metabolische activering vereist is		
Benzo[*a*]pyreen	50-32-8	
Cyclofosfamide (monohydraat)	50-18-0 (6055-19-2)	
7,12-Dimethylbenzantraceen	57-97-6	
3-Methylcholantreen	56-49-5	

PROCEDURE

Behandeling met teststof

33. Delende cellen worden zowel met als zonder metabool activeringssysteem met de teststof behandeld. De blootstelling moet gedurende een geschikte periode worden uitgevoerd (meestal is 3 tot 4 uur voldoende). Er zij echter opgemerkt dat deze eisen voor geneesmiddelen voor menselijk gebruik anders kunnen zijn (59). Voor de MLA moet in gevallen waarin een korte behandeling negatieve resultaten oplevert en er informatie is waaruit kan worden opgemaakt dat mogelijk een langere behandeling nodig is [bv. nucleosideanalogen, slecht oplosbare chemische stoffen (5) (59)], worden overwogen om de test uit te voeren met een langere behandeling, d.w.z. 24 uur zonder S9.

34. Het minimale aantal cellen dat voor elke testcultuur (controle en behandeld) in elke fase van de test wordt gebruikt, moet worden gekozen op basis van de spontane mutantfrequentie. Een algemene vuistregel is om in elke testcultuur voldoende cellen te behandelen en over te enten om in alle fasen van de test (behandeling, fenotypische expressie en selectie van de mutanten) ten minste 10, liefst 100 spontane mutanten over te houden (56).

35. Voor de MLA ligt de aanbevolen aanvaardbare spontane mutantfrequentie tussen de 35-140 × 10^{-6} (agarversie) en 50-170 × 10^{-6} (microtiterplaat-versie) (zie tabel 2). Om voor elke testcultuur ten minste 10 en idealiter 100 spontane mutanten te hebben die de behandeling overleven, moeten er ten minste 6 × 10^{6} cellen worden behandeld. Door dit aantal cellen te behandelen en voldoende cellen over te houden tijdens de expressie en de klonering voor het selecteren van mutanten, zijn er in alle fasen van het experiment voldoende spontane mutanten (10 of meer), ook voor de culturen die worden behandeld met concentraties die 90 % cytotoxiciteit vertonen (zoals gemeten door een RTF van 10 %) (19) (38) (39).

36. Voor de TK6 ligt de spontane mutantfrequentie meestal tussen de 2 en 10 × 10^{-6}. Om voor elke cultuur ten minste 10 spontane mutanten te hebben die de behandeling overleven, moeten er ten minste 20 × 10^{6} cellen worden behandeld. Door dit aantal cellen te behandelen zijn er steeds voldoende spontane mutanten (10 of meer), ook voor de culturen die worden behandeld met concentraties die tijdens de behandeling 90 % cytotoxiciteit veroorzaken (10 % RS). Bovendien moeten er tijdens de expressieperiode voldoende cellen worden gekweekt en uitgeplaat voor het selecteren van de mutanten (60).

Fenotypische expressietijd en meting van de cytotoxiciteit en de mutantfrequentie

37. Aan het einde van de behandelingsperiode worden de cellen gedurende een vooraf vastgestelde periode gekweekt om een vrijwel optimale fenotypische expressie van de geïnduceerde mutanten mogelijk te maken. Deze periode is specifiek voor elke cellijn. Voor de MLA is de fenotypische expressieperiode 2 dagen. Voor de TK6 is de fenotypische expressieperiode 3-4 dagen. Als een 24-uursbehandeling wordt toegepast, begint de expressieperiode na het einde van de behandeling.

38. Gedurende de fenotypische expressieperiode worden de cellen elke dag geteld. Voor de MLA worden de dagelijkse celaantallen gebruikt om de dagelijkse suspensiegroei (SG) te berekenen. Na de expressieperiode van 2 dagen worden de cellen gesuspendeerd in medium met en zonder selecterende stof voor om respectievelijk het aantal mutanten (selectieplaten) en de kloneringsefficiëntie (levensvatbaarheidsplaten) te bepalen. Voor de MLA zijn er twee even aanvaardbare methoden voor de klonering voor het selecteren van de mutanten; de ene met zachte agar en de andere met vloeibaar medium in 96-putjesplaten (19) (38) (39). In de TK6 wordt de klonering uitgevoerd met vloeibare media en 96-putjesplaten (16).

39. Trifluorthymidine (TFT) is de enig aanbevolen selecterende stof voor *TK*-mutanten (61).

40. Voor de MLA worden agarplaten en microtiterplaten na 10-12 dagen incubatie geteld. Voor de TK6 worden kolonies in microtiterplaten na 10-14 dagen gescoord op de

vroeg verschijnende mutanten. Om de langzaam groeiende (laat verschijnende) TK6-mutanten in aanmerking te nemen is het nodig de cellen na telling van de vroeg verschijnende mutanten nogmaals met groeimedium en TFT te voeden en de platen vervolgens nog 7-10 dagen te incuberen (62). Zie de punten 42 en 44 voor een bespreking van het tellen van de langzaam en snel groeiende *TK*-mutanten.

41. De benodigde berekeningen voor de beide tests, inclusief de twee methoden (agar en microtiterplaat) voor de MLA, worden gegeven in aanhangsel 2. Als de MLA wordt uitgevoerd volgens de agarmethode, worden de kolonies geteld en wordt het aantal mutantkolonies gecorrigeerd met de kloneringsefficiëntie om een MF te berekenen. In de microtiterplaatversie van de MLA en in de TK6 wordt de kloneringsefficiëntie voor zowel de selectieplaten als de kloneringsefficiëntieplaten bepaald aan de hand van de Poisson-verdeling (63). Uit deze beide kloneringsefficiënties wordt de MF berekend.

Karakterisering van de mutantkolonies

42. Als in de MLA de teststof positief is (zie de punten 62-63), moeten bij ten minste een van de testculturen (normaal gesproken de hoogste aanvaardbare positieve concentratie) en bij de negatieve en positieve controles de kolonies worden gekarakteriseerd door de grootte of de groei van de kolonies te inventariseren. Als de teststof negatief is (zie punt 64), moeten de mutantkolonies worden gekarakteriseerd bij de negatieve en positieve controles. Als de MLA wordt uitgevoerd met microtiterplaten, worden mutanten die kleine kolonies vormen gedefinieerd als mutanten waarvan de kolonies minder dan 25 % van de diameter van het putje beslaan en mutanten die grote kolonies vormen als mutanten waarvan de kolonies meer dan 25 % van de diameter van het putje beslaan. Bij de agarmethode wordt voor het tellen van de mutantkolonies en het inventariseren van de koloniegrootte een automatische kolonieteller gebruikt. Methoden voor het inventariseren van de koloniegrootte worden uitvoerig beschreven in de literatuur (19) (38) (40). Karakterisering van de kolonies van de negatieve en positieve controles is nodig om aan te tonen dat de tests naar behoren worden uitgevoerd.

43. De teststof kan niet als negatief worden aangemerkt als zowel de mutanten die grote kolonies vormen als de mutanten die kleine kolonies vormen onvoldoende worden gedetecteerd in de positieve controle. De karakterisering van de kolonies kan worden gebruikt om algemene informatie te verkrijgen over het vermogen van de teststof om puntmutaties en/of chromosomale gebeurtenissen te veroorzaken (punt 4).

44. TK6: normaal groeiende en langzaam groeiende mutanten worden van elkaar onderscheiden door een verschil in incubatietijd (zie punt 40). Voor de TK6 worden normaal gesproken voor alle culturen, inclusief de negatieve en positieve controles, zowel de vroeg als de laat verschijnende mutanten gescoord. Karakterisering van de

kolonies van de negatieve en positieve controles is nodig om aan te tonen dat de tests naar behoren worden uitgevoerd. De teststof kan niet als negatief worden aangemerkt als zowel de vroeg verschijnende als de laat verschijnende mutanten onvoldoende worden gedetecteerd in de positieve controle. De karakterisering van de kolonies kan worden gebruikt om algemene informatie te verkrijgen over het vermogen van de teststof om puntmutaties en/of chromosomale gebeurtenissen te veroorzaken (punt 4).

Bekwaamheid van het laboratorium

45. Om aan te tonen over voldoende ervaring met de test te beschikken vooraleer wordt overgegaan tot routinematig gebruik ervan, moet het laboratorium een reeks experimenten hebben verricht met positieve controlestoffen die via verschillende mechanismen werken (ten minste één die actief is met en één die actief is zonder metabole activering, gekozen uit de stoffen die zijn opgesomd in tabel 1) en met verschillende negatieve controles (waaronder onbehandelde culturen en verschillende oplosmiddelen/vehicula). Deze positieve en negatieve controleresponsen moeten in overeenstemming zijn met de literatuur. Deze vereiste geldt niet voor laboratoria die ervaring hebben, d.w.z. die beschikken over referentiegegevens uit het verleden zoals omschreven in de punten 47-50. Voor de MLA moeten de waarden die worden verkregen met de positieve en negatieve controles, consistent zijn met de aanbevelingen van de IWGT (zie tabel 2).

46. Om te bewijzen dat het laboratorium bekwaam is om mutagene chemische stoffen op te sporen, de doeltreffendheid van het metabole-activeringssysteem te bepalen en de geschiktheid van de celgroeiomstandigheden tijdens behandeling, fenotypische expressie en selectie van de mutanten en de geschiktheid van de scoringsprocedures aan te tonen, moet er een selectie van positieve controlestoffen (zie tabel 1) worden onderzocht zowel met korte en lange behandeling (indien lange behandelingen worden toegepast) zonder metabole activering, als met korte behandeling met metabole activering. Er moet een bereik van concentraties van de geselecteerde stoffen worden gekozen dat reproduceerbare en concentratiegerelateerde stijgingen tot boven het achtergrondniveau oplevert, om de gevoeligheid en het dynamisch bereik van het testsysteem aan te tonen.

Controlegegevens uit het verleden

47. Het laboratorium stelt vast:

- een historisch bereik en historische spreiding voor de positieve controles;
- een historisch bereik en historische spreiding voor de negatieve controles (met onbehandelde controlestoffen of oplosmiddelen).

48. Wanneer voor het eerst gegevens worden vergaard voor een historische spreiding voor negatieve controles, dienen gelijktijdige negatieve controles te stroken met

gepubliceerde gegevens over negatieve controles. Naarmate meer gegevens uit experimenten aan de controlespreiding worden toegevoegd, dienen gelijktijdige negatieve controles idealiter binnen de controlegrens van 95 % voor die spreiding te vallen (64) (65).

49. De databank met gegevens over negatieve controles uit het verleden van het laboratorium moet aanvankelijk worden samengesteld op basis van minimaal 10 experimenten, maar bestaat bij voorkeur uit ten minste 20 experimenten die onder vergelijkbare experimentele omstandigheden werden uitgevoerd. Laboratoria dienen methoden voor kwaliteitscontrole, zoals regelkaarten (bv. C-kaart of X-kaart (65)), te gebruiken om na te gaan hoe variabel hun gegevens over positieve en negatieve controles zijn en om aan te tonen dat zij de methodologie "onder controle" hebben (66). Nadere bijzonderheden en aanbevelingen wat betreft de opbouw en het gebruik van een databank met historische gegevens zijn te vinden in de literatuur (64).

50. Negatieve controlegegevens moeten bestaan uit de mutantfrequenties van enkelvoudige of bij voorkeur duploculturen zoals beschreven in punt 27. Gelijktijdige negatieve controles liggen idealiter binnen de 95 %-controlegrenzen van de verdeling van de verzameling historische negatieve controlegegevens van het laboratorium. Wanneer gegevens van negatieve controles buiten de 95 %-controlegrens vallen, kan opneming ervan in de historische controleverdeling toch aanvaardbaar zijn zolang deze gegevens geen extreme uitschieters zijn, er bewijs is dat het testsysteem "onder controle" is (zie punt 49) en er geen bewijs is van technisch of menselijk falen.

51. Eventuele aanpassingen van het testprotocol moeten worden bekeken vanuit het oogpunt van de samenhang van de gegevens met de bestaande historische controledatabanken van het laboratorium. Eventuele grote inconsistenties moeten leiden tot de oprichting van een nieuwe databank met historische controlegegevens.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Presentatie van de resultaten

52. Voor zowel de MLA als de TK6 moeten in de presentatie van de gegevens voor zowel de behandelde culturen als de controleculturen alle gegevens worden opgenomen die nodig zijn om de cytotoxiciteit (respectievelijk RTG of RS) en de mutantfrequenties te berekenen, zoals hieronder beschreven.

53. Voor de MLA moeten voor elke cultuur apart gegevens worden verstrekt over de RSG, de RTG, de kloneringsefficiëntie op het moment van selecteren van de mutanten en het aantal mutantkolonies (voor de agarversie) of het aantal lege putjes (voor de microtiterplaatversie). De MF moet worden uitgedrukt als het aantal mutantcellen per miljoen overlevende cellen. Als de respons positief is, moeten voor

ten minste één concentratie van de teststof (normaal gesproken de hoogste positieve concentratie) en de negatieve en positieve controles MF's voor kleine en grote kolonies (en/of percentage van de totale MF) worden verstrekt. Als de respons negatief is, moeten voor de negatieve controle en de positieve controle de MF's voor kleine en grote kolonies worden verstrekt.

54. Voor de TK6 moeten voor elke cultuur apart gegevens worden verstrekt over de RS, de kloneringsefficiëntie op het moment van selecteren van de mutanten en het aantal lege putjes voor vroeg verschijnende en laat verschijnende mutanten. De MF's moeten worden uitgedrukt als de verhouding tussen het aantal mutantcellen en het aantal overlevende cellen, waarbij zowel de totale MF als de MF (en/of het percentage van de totale MF) van de vroeg verschijnende en laat verschijnende mutanten moeten worden verstrekt.

Aanvaardbaarheidscriteria

55. Voor zowel de MLA als de TK6 moet aan de volgende criteria worden voldaan, voordat de algemene resultaten voor een bepaalde teststof worden vastgesteld:

- de test is onder twee experimentele omstandigheden uitgevoerd (korte behandeling met en zonder metabole activering – zie punt 33), tenzij één al positieve resultaten heeft opgeleverd;
- er moet een voldoende aantal cellen en concentraties geanalyseerd kunnen worden (zie punten 27 en 34-36);
- de criteria voor de selectie van de hoogste concentratie zijn consistent met de criteria beschreven in de punten 28-30.

Aanvaardbaarheidscriteria voor de negatieve en positieve controles

56. De MLA-deskundigenwerkgroep van de IWGT heeft een grote hoeveelheid MLA-gegevens geanalyseerd, wat geresulteerd heeft in een internationale consensus voor specifieke aanvaardbaarheidscriteria voor de MLA (1) (2) (3) (4) (5). In deze testmethode worden dan ook specifieke aanbevelingen gedaan voor het bepalen van de aanvaardbaarheid van negatieve en positieve controles en voor het beoordelen van de resultaten voor een bepaalde stof in de MLA. De databank voor de TK6 is veel kleiner en is niet door een werkgroep geëvalueerd.

57. Voor de MLA moet elk experiment worden geëvalueerd om te bepalen of de onbehandelde controle/oplosmiddelcontrole aan de aanvaardbaarheidscriteria van de MLA-deskundigenwerkgroep van de IWGT voldoet ((4) en tabel 2 hieronder) voor de: 1) MF (er zij op gewezen dat de IWGT voor de aanvaardbaarheid van de MF verschil maakt tussen de agarversie en de microtiterplaatversie van de MLA), 2) de kloneringsefficiëntie (CE) op het moment van selecteren van de mutanten en 3) de

suspensiegroei (SG) voor de oplosmiddelcontrole (zie aanhangsel 2 voor de formules).

Tabel 2: Aanvaardbaarheidscriteria voor de MLA

Parameter	**Methode met zachte agar**	**Methode met microtiterplaten**
Mutantfrequentie	$35 – 140 \times 10^{-6}$	$50 – 170 \times 10^{-6}$
Kloneringsefficiëntie	65 – 120 %	65 – 120 %
Suspensiegroei	8- tot 32-voudig (behandeling van 3-4 uur) 32- tot 180-voudig (behandeling van 24 uur, indien uitgevoerd)	8- tot 32-voudig (behandeling van 3-4 uur) 32- tot 180-voudig (behandeling van 24 uur, indien uitgevoerd)

58. Voor de MLA moet elke test ook worden geëvalueerd om te bepalen of voor de positieve controle(s) aan ten minste één van de volgende twee door de MLA-deskundigenwerkgroep van de IWGT ontwikkelde aanvaardbaarheidscriteria wordt voldaan:

- de positieve controle moet een absolute toename in de totale MF vertonen, d.w.z. een toename die hoger is dan de spontane achtergrond-MF (een geïnduceerde MF, of IMF) van ten minste 300×10^{-6}. De MF van de kleine kolonies moet goed zijn voor ten minste 40 % van de IMF;
- de positieve controle vertoont een toename in de MF voor kleine kolonies van ten minste 150×10^{-6} boven de MF in de gelijktijdige onbehandelde controle/oplosmiddelcontrole (een IMF voor kleine kolonies van 150×10^{-6}).

59. Voor de TK6 is de test aanvaardbaar als toevoeging van de gelijktijdige negatieve controle aan de databank met historische negatieve controlegegevens van het laboratorium zoals beschreven in de punten 48-49 aanvaardbaar wordt geacht. Bovendien moeten de gelijktijdige positieve controles (zie punt 32) reacties induceren die verenigbaar zijn met de reacties in de databank met historische positieve controlegegevens en moeten een statistisch significante toename opleveren vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle.

60. Voor beide tests moet de bovengrens voor de cytotoxiciteit die wordt waargenomen in de positievecontrolecultuur, gelijk zijn aan die in de experimentele culturen. Met andere woorden: de RTG/RS mag niet lager zijn dan 10 %. Om aan te tonen dat aan de aanvaardbaarheidscriteria voor de positieve controle wordt voldaan, is het voldoende om een enkele concentratie te gebruiken (of een van de concentraties van de positievecontroleculturen als er meer dan een concentratie wordt gebruikt).

Bovendien moet de MF van de positieve controle binnen het aanvaardbare bereik liggen dat voor het laboratorium is vastgesteld.

Beoordeling en interpretatie van resultaten

61. Voor de MLA heeft de MLA-werkgroep van de IWGT veel werk verricht op het vlak van de biologische relevantie en de criteria voor een positieve respons (4). Daarom zijn in deze testmethode specifieke aanbevelingen opgenomen voor het interpreteren van de teststofresultaten van de MLA (zie de punten 62-64). De databank voor de TK6 is veel kleiner en is niet door een werkgroep geëvalueerd. De aanbevelingen voor het interpreteren van de gegevens voor de TK6 worden dan ook in veel algemenere termen geformuleerd (zie de paragrafen 65-66). Bovendien worden er aanvullende aanbevelingen gedaan die voor beide tests gelden (zie de punten 67-71).

MLA

62. Er wordt een benadering aanbevolen voor het definiëren van positieve en negatieve responsen om er zeker van te zijn dat de toegenomen MF biologisch relevant is. In plaats van de statistische analyse die doorgaans voor andere tests wordt gebruikt, berust deze benadering op het gebruik van een vooraf bepaalde geïnduceerde mutantfrequentie (d.w.z. toename in de MF boven de gelijktijdige controle), die de Global Evaluation Factor (GEF) wordt genoemd en die is gebaseerd op een analyse van de distributie van de MF-gegevens voor de negatieve controle van deelnemende laboratoria (4). Voor de agarversie van de MLA is de GEF 90×10^{-6}, voor de microtiterplaatversie 126×10^{-6}.

63. Mits aan alle aanvaardbaarheidscriteria wordt voldaan, wordt een teststof als duidelijk positief beschouwd als in om het even welke van de onderzochte experimentele omstandigheden (zie punt 33) de toename van de MF boven de gelijktijdige achtergrond groter is dan de GEF en er een verband is tussen de toename en de concentratie (bv. aan de hand van een trendtoets). De teststof wordt dan in staat geacht mutatie te induceren in dit testsysteem.

64. Mits aan alle aanvaardbaarheidscriteria wordt voldaan, wordt een teststof als duidelijk negatief beschouwd als er in alle onderzochte experimentele omstandigheden (zie punt 33) geen enkele concentratiegerelateerde respons is of, wanneer er wel een toename is in de MF, als deze niet groter is dan de GEF. De teststof wordt dan niet in staat geacht mutaties te induceren in dit testsysteem.

TK6

65. Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt de teststof als duidelijk positief beschouwd als in een of meer van de onderzochte experimentele omstandigheden (zie punt 33):

- ten minste één van de testconcentraties een statistisch significante toename vertoont vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle;
- de toename concentratiegerelateerd is bij evaluatie met een geschikte trendtoets (zie punt 33);
- een of meer van de resultaten buiten de verdeling van de historische negatieve controlegegevens vallen (bv. op Poisson-verdeling gebaseerde 95 %-controlegrens; zie punt 48).

Wanneer aan al deze criteria is voldaan, wordt de teststof in staat geacht mutaties te induceren dit testsysteem. Aanbevelingen voor de meest geschikte statistische methoden zijn te vinden in de literatuur (66) (67).

66. Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt de teststof als duidelijk negatief beschouwd als in alle onderzochte experimentele omstandigheden (zie punt 33):

- geen van de testconcentraties een statistisch significante toename vertoont vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle;
- er geen concentratiegerelateerde toename is bij evaluatie met een geschikte trendtoets;
- alle resultaten binnen de verdeling van de historische negatieve controlegegevens vallen (bv. op Poisson-verdeling gebaseerde 95 %-controlegrens; zie punt 48).

De teststof wordt dan niet in staat geacht mutaties te induceren in dit testsysteem.

Voor zowel MLA als TK6:

67. Als de maximale concentratie is gebaseerd op cytotoxiciteit, moet voor de hoogste concentratie worden gestreefd naar een RTG/RS tussen de 20 en 10 %. Er is consensus over dat er bij de interpretatie van positieve resultaten voor moet worden gezorgd dat deze niet alleen worden gevonden tussen 20 en 10 % RTG/RS en dat een resultaat niet als positief mag worden beschouwd als de toename in de MF alleen is opgetreden bij 10 % RTG/RS of lager (indien beoordeeld) (2) (59).

68. In sommige omstandigheden kunnen aanvullende gegevens nuttig zijn om vast te stellen dat een teststof niet mutageen is wanneer geen enkele cultuur een RTG-waarde vertoont van 10-20 % RTG/RS. Het betreft de volgende situaties: 1) Er is geen bewijs voor mutageniteit (bv. geen dosis-respons, geen MF's die hoger zijn dan de MF's in de gelijktijdige negatieve controle of de historische achtergrondbereiken enz.) in een reeks van gegevenspunten tussen de 100 % en 20 % RTG/RS en er is ten minste één gegevenspunt tussen de 20 en 25 % RTG/RS. 2) Er is geen bewijs voor mutageniteit (bv. geen dosis-respons, geen MF's die hoger zijn dan de MF's in de gelijktijdige negatieve controle of de historische achtergrondbereiken enz.) in een reeks van

gegevenspunten tussen de 100 % en 25 % RTG/RS en er is ook een negatief gegevenspunt vlak onder de 10 % RTG/RS. In elk van beide situaties kan worden geconcludeerd dat de teststof negatief is.

69. Een duidelijk positieve of negatieve reactie behoeft niet te worden bevestigd.

70. In gevallen waarin de reactie noch duidelijk negatief noch duidelijk positief is zoals hierboven beschreven, en/of om de biologische relevantie van een resultaat te helpen vaststellen, moeten de gegevens door een deskundige en/of nader onderzoek worden beoordeeld. Het uitvoeren van een herhalingsexperiment onder mogelijk aangepaste experimentele omstandigheden [bv. concentratie-intervallen om de kans te vergroten dat gegevenspunten worden gevonden die binnen het bereik van 10-20 % RTG/RS liggen, andere omstandigheden bij metabole activering (d.w.z. S9-concentratie of S9-herkomst) en duur van de behandeling] kan nuttig zijn.

71. In zeldzame gevallen zal op basis van de gegevens, zelfs na nader onderzoek, niet kunnen worden geconcludeerd dat de resultaten positief of negatief zijn. De reactie op de teststof moet dan als moeilijk te interpreteren worden beschouwd (geïnterpreteerd als even waarschijnlijk positief als negatief).

TESTVERSLAG

72. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

- bron, partijnummer, uiterste gebruiksdatum, indien beschikbaar;
- stabiliteit van de teststof, indien bekend;
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel, indien bekend;
- meting van pH, osmolaliteit en neerslag in het kweekmedium waaraan de teststof werd toegevoegd, indien van toepassing.

Stof die uit één component bestaat:

- fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water en aanvullende relevante fysisch-chemische eigenschappen;
- chemische identificatiegegevens, zoals IUPAC- of CAS-naam, CAS-nummer, SMILES- of InChI-code, structuurformule, zuiverheid, chemische identiteit van onzuiverheden, indien van toepassing en praktisch haalbaar enz.

Stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB's en mengsels:

- voor zover mogelijk, karakterisering aan de hand van chemische identiteit (zie hierboven), kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen van de bestanddelen.

Oplosmiddel:

- motivering van de keuze van het oplosmiddel;
- percentage oplosmiddel in het uiteindelijke kweekmedium.

Cellen:

Voor de voorraadculturen van het laboratorium:

- type en bron van de cellen en geschiedenis van het testlaboratorium;
- kenmerken van het karyotype en/of modaal aantal chromosomen;
- methoden om de celculturen in leven te houden;
- afwezigheid van mycoplasma;
- verdubbelingstijden.

Testomstandigheden:

- achtergrond voor de keuze van de concentraties en het aantal celculturen, bijvoorbeeld gegevens over de cytotoxiciteit en beperkte oplosbaarheid;
- samenstelling van het medium, CO_2-concentratie, vochtigheidsgraad;
- concentratie van de teststof uitgedrukt als uiteindelijke concentratie in het kweekmedium (bv. µg of mg/ml of mM van kweekmedium);
- toegevoegde concentratie (en/of volume) van het oplosmiddel en de teststof in het kweekmedium;
- incubatietemperatuur;
- incubatietijd;
- duur van de behandeling;
- celdichtheid bij de behandeling;
- aard en samenstelling van het metabool activeringssysteem (bron van S9, methode voor de bereiding van de S9-mix, de concentratie of het volume van de S9-mix en S9 in het uiteindelijke kweekmedium, kwaliteitscontroles van S9);
- positieve en negatieve controlestoffen, uiteindelijke concentraties voor alle behandelingsomstandigheden;

- duur van de expressieperiode (met vermelding van het aantal geënte cellen en schema's voor enting en overenting, indien van toepassing;
- identiteit en concentratie van de selecterende stof;
- voor de MLA moet worden aangegeven welke versie is gebruikt (agar of microtiterplaat);
- criteria voor de aanvaardbaarheid van de tests;
- methoden die zijn gebruikt om het aantal levensvatbare en mutantcellen te bepalen;
- methoden die zijn gebruikt om de cytotoxiciteit te meten;
- eventuele aanvullende informatie die betrekking heeft op de cytotoxiciteit en gebruikte methode;
- duur van de incubatietijden na uitplating;
- definitie van kolonies van een bepaalde omvang en aard (bv. criteria voor "kleine" en "grote" kolonies);
- criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is;
- gebruikte methoden voor het bepalen van de pH, osmolaliteit, indien uitgevoerd, en neerslag, indien van toepassing.

Resultaten:

- aantal behandelde cellen en aantal overgeënte cellen voor elke cultuur;
- toxiciteitsparameters (RTG voor MLA en RS voor TK6);
- tekenen van neerslag en tijdstip van de bepaling;
- aantal uitgeplate cellen in selectief en niet-selectief medium;
- aantal kolonies in niet-selectief medium en aantal resistente kolonies in selectief medium en bijbehorende mutantfrequenties;
- inventarisatie van de grootte van de kolonies voor de negatieve en positieve controles en, als de teststof positief is, ten minste een concentratie, en bijbehorende mutantfrequenties;
- indien mogelijk het verband tussen concentratie en respons;
- gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve (oplosmiddel) en positieve controles (concentraties en oplosmiddelen);
- gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve (oplosmiddel) en positieve controles (concentraties en oplosmiddelen) met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking. aantal tests waarop de historische controles zijn gebaseerd;

- statistische analyses (voor afzonderlijke culturen en gepoolde duplo's indien van toepassing), en eventuele p-waarden; en voor de MLA, de GEF-evaluatie.

Bespreking van de resultaten

Conclusie

LITERATUUR

(1) Moore, M.M., Honma, M. Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185-190.

(2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292-299.

(3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127-140.

(4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1-5.

(5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the

International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36-40.

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

(7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): 21-28.

(8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1-2): 101-114.

(9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol*. Sci.*,* 109 (1): 96-105.

(10) 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. National. Academy. Sci. USA, 87 (1): 51-55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/TK$^{+/-}$ Leads to TK$^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169-181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y TK$^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237-242.

(13) 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 (TFTr) Mutants of L5178Y/TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res.*,* 151 (1): 161-174.

(14) Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): 143-153.

(15) Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): 77-87.

(16) Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): 89-98.

(17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203-14.

(18) Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. Mutation Res., 267 (1): 89-95.

(19) Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.

(20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. and Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634 (1-2): 177-183.

(21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439-452.

(22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): 879-886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): 297-305.

(24) 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: 147-204.

(25) Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. Mutation Res., 626 (1-2): 185-190.

(26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: 673-680.

(27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/- - Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): 61-108.

(28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243-253.

(29) Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181-193.

(30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127-131.

(31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): 35-42.

(32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation. Res., 373 (2): 157-165.

(33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Mutagen., 19 (4): 263-268.

(34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84 (2): 411-416.

(35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45 (2-3): 162-176.

(36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. Cancer. Res., 55 (1): 12-15.

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

(38) Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.

(39) Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. In: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z and Caldwell(Eds) , 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): 467-485.

(41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA, 33 (3): 261-287.

(42) Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4-5): 287-294.

(43) 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 (6): 347-364.

(44) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173-215.

(45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37 (1): 83-90.

(46) Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66 (3): 277-290.

(47) Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. *Pathol*. *Toxicol.,* 4 (1): 55-65

(48) Elliott, 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. Mutagen., 7 (3): 175-177.

(49) 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., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): 241-261.

(51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen*.,* 28 (1): 51-59.

(52) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP).

(53) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L.and Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, pp. 91-103.

(54) 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. Environ. Mutagen., 5 (6): 795-801.

(55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122-130.

(56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(57) Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32-56.

(58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36-43.

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

(60) Honma M. and Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373-384.

(61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient ($TK^{-/-}$) Mutants from L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363-378.

(62) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9-17.

(63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): 1-8.

(64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87-90.

(65) Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.

(66) OESO (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 199), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

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

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Aneugeen: elke chemische stof die of elk proces dat leidt tot aneuploïdie in cellen of organismen door de wisselwerking met componenten van de mitose en meiose in de celdelingscyclus.

Aneuploïdie: elke afwijking van het normale diploïde (of haploïde) aantal chromosomen met één chromosoom of meer dan één chromosoom, maar niet met (een) volledige reeks(en) chromosomen (polyploïdie).

Chemische stof: een stof of een mengsel.

Clastogeen: elke chemische stof die of elk proces dat structurele chromosoomafwijkingen veroorzaakt in populaties van cellen of organismen.

Cytotoxiciteit: voor de bepalingen bestreken in deze testmethode is cytotoxiciteit gelijkgesteld aan een vermindering van de relatieve totale groei (RTG) voor de MLA of de relatieve overleving (RS) voor de TK6.

Fenotypische expressietijd: de tijd na behandeling waarin de genetische verandering gefixeerd wordt in het genoom en ongewijzigde genproducten verdwijnen, zodat het fenotypische kenmerk verandert.

Genotoxisch: een algemene term die alle typen DNA- of chromosoombeschadiging omvat, waaronder DNA-breuken, adductherschikkingen, mutaties, chromosoomafwijkingen en aneuploïdie. Niet alle soorten genotoxische effecten leiden tot mutaties of stabiele chromosoombeschadiging.

Kloneringsefficiëntie: Percentage van in lage dichtheid uitgeplate cellen die in staat zijn om uit te groeien tot een kolonie die geteld kan worden.

Mitotische recombinatie: recombinatie tussen homologe chromatiden tijdens de mitose, die mogelijk leidt tot de inductie van breuken in het dubbelstrengig DNA of verlies van heterozygotie.

Mutageen: produceert een erfelijke wijziging van DNA-basenpaarsequentie(s) in genen of van de structuur van chromosomen (chromosoomafwijkingen).

Mutagenen met basenpaarvervanging: chemische stoffen die vervanging van een of meer basenparen in het DNA veroorzaken.

Mutagenen met leesraamverschuiving: chemische stoffen die invoeging of deletie van een of meer basenparen in het DNA-molecuul veroorzaken.

Mutantfrequentie (MF): de verhouding tussen het aantal waargenomen mutantcellen en het aantal levensvatbare cellen.

Onbehandelde controles: culturen die geen behandeling ondergaan (d.w.z. noch teststof noch oplosmiddel), maar op dezelfde wijze worden verwerkt als de culturen die de teststof ontvangen.

Oplosmiddelcontrole: algemene term om de controleculturen aan te duiden die uitsluitend het oplosmiddel ontvangen dat wordt gebruikt om de teststof op te lossen.

Relatieve overleving (RS): de RS wordt gebruikt als maat voor behandelingsgerelateerde cytotoxiciteit in de TK6. De RS is de relatieve kloneringsefficiëntie (CE) van onmiddellijk na de celbehandeling uitgeplate cellen, gecorrigeerd voor eventueel verlies van cellen gedurende de behandeling, vergeleken met de kloneringsefficiëntie van de negatieve controle.

Relatieve suspensiegroei (RSG): voor de MLA: de relatieve, totale suspensiegroei over twee dagen van de testcultuur, vergeleken met de totale suspensiegroei over twee dagen van de negatieve/oplosmiddelcontrole (Clive en Spector, 1975). De RSG moet de relatieve groei omvatten van de testcultuur vergeleken met de negatieve/oplosmiddelcontrole tijdens de behandelingsperiode.

Relatieve totale groei (RTG): de RTG wordt gebruikt als maat voor behandelingsgerelateerde cytotoxiciteit in de MLA. De RTG is een maat voor de relatieve groei (ten opzichte van de vehiculumcontrole) van de testculturen tijdens de behandelingsfase, de tweedaagse expressiefase en de fase van de klonering voor het selecteren van de mutanten. De RSG van elke testcultuur wordt vermenigvuldigd met de relatieve kloneringsefficiëntie van de testcultuur op het moment van selecteren van de mutanten en uitgedrukt ten opzichte van de kloneringsefficiëntie van de negatieve/oplosmiddelcontrole (Clive en Spector, 1975).

S9-leverfractie: supernatant van leverhomogenaat na centrifugering bij 9000 g, d.w.z. ruw leverextract.

S9-mix: mix van de S9-leverfractie en cofactoren die nodig zijn voor de metabole enzymactiviteit.

Suspensiegroei (SG): de x-voudige toename van het aantal cellen in de loop van de behandelingsfase en de expressiefase van de MLA. Voor de korte (3 of 4 uur) behandeling wordt de SG berekend door de x-voudige toename op dag 1 te vermenigvuldigen met de x-voudige toename op dag 2. Als een 24-urige behandeling wordt toegepast, is de SG de x-voudige toename gedurende de 24-urige behandeling, vermenigvuldigd met de x-voudige toenamen op expressiedagen 1 en 2.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

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.

Aanhangsel 2

FORMULES

Cytotoxiciteit

Voor beide versies (agar en microtiterplaat) van de MLA

De cytotoxiciteit wordt gedefinieerd als de relatieve totale groei (RTG), die de relatieve suspensiegroei (RSG) omvat tijdens de 2-daagse expressieperiode en de relatieve kloneringsefficiëntie (RCE) verkregen op het moment van selecteren van de mutanten. De RTG, RSG en RCE worden alle drie uitgedrukt als percentage.

Berekening van de RSG: de suspensiegroei één (SG_1) is de groeisnelheid tussen dag 0 en dag 1 (celconcentratie op dag 1 / celconcentratie op dag 0) en suspensiegroei twee (SG_2) is de groeisnelheid tussen dag 1 en dag 2 (celconcentratie op dag 2 / celconcentratie op dag 1). De RSG is de totale SG ($SG_1 \times SG_2$) voor de behandelde cultuur vergeleken met de onbehandelde/oplosmiddelcontrole. Dus: RSG = $[SG_{1(test)} \times SG_{2(test)}] / [SG_{1(controle)} \times SG_{2(controle)}]$ De SG_1 moet worden berekend vanaf de oorspronkelijke celconcentratie die is gebruikt aan het begin van de behandeling van de cellen. De RSG houdt rekening met eventuele verschillen in cytotoxiciteit die optreden in de testcultu(u)r(en) tijdens de behandeling van de cellen.

De RCE is de relatieve kloneringsefficiëntie van de testcultuur vergeleken met de relatieve kloneringsefficiëntie van de onbehandelde/oplosmiddelcontrole, verkregen op het moment van selecteren van de mutanten.

Relatieve totale groei (RTG): RTG=RSG × RCE

TK6

Relatieve overleving (RS):

De cytotoxiciteit wordt beoordeeld aan de hand van de relatieve overleving, d.w.z. de kloneringsefficiëntie (CE) van onmiddellijk na de behandeling uitgeplate cellen, gecorrigeerd voor eventueel verlies van cellen gedurende de behandeling, vergeleken met de kloneringsefficiëntie in de negatieve controles (waaraan een overleving van 100 % wordt toegekend). De correctie voor verlies van cellen tijdens de behandeling kan worden berekend als:

$$\text{Gecorrigeerde CE} = \text{CE} \times \frac{Aantal\ cellen\ aan\ het\ einde\ van\ de\ behandeling}{Aantal\ cellen\ aan\ het\ begin\ van\ de\ behandeling}$$

De RS voor een met een teststof behandelde cultuur wordt berekend als:

$$RS = \frac{Gecorrigeerde\ CE\ in\ de\ behandelde\ cultuur}{Gecorrigeerde\ CE\ in\ de\ oplosmiddelcontrole} \times 100$$

Mutantfrequentie voor zowel MLA als TK6:

De mutantfrequentie (MF) is de kloneringsefficiëntie van mutantkolonies in selectief medium (CE_M) gedeeld door de kloneringsefficiëntie in niet-selectief medium op het moment van selecteren van de mutanten (CE_V). Dat wil zeggen: $MF = CE_M / CE_V$. De berekening van deze twee kloneringsefficiënties wordt hieronder beschreven voor zowel de kloneringsmethode in agar als die in microtiterplaten.

***MLA in Agar**:* in de versie van de MLA in zachte agar, worden het aantal kolonies op de plaat voor het selecteren van de mutanten (C_M) en het aantal kolonies op de ongeselecteerde plaat/de plaat voor het bepalen van de kloneringsefficiëntie (telling van levensvatbare cellen) (C_V) verkregen door rechtstreekse telling van de klonen. Wanneer er 600 cellen worden uitgeplaat voor het bepalen van de kloneringsefficiëntie (CE) voor de platen voor het selecteren van mutanten (CE_M) en de ongeselecteerde platen/de platen voor het bepalen van de kloneringsefficiëntie (telling van levensvatbare cellen) (CE_V) en er voor het selecteren van de mutanten 3×10^6 cellen worden gebruikt,

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

MLA en TK6 in microtiterplaten: in de microtiterplaatversie van de MLA, worden C_M en C_V bepaald door het waarschijnlijke aantal kolonies per putje (P) te vermenigvuldigen met het totale aantal putjes (TW) op de microtiterplaten.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Vanaf de nulterm van de Poissonverdeling (Furth *et al.*, 1981) wordt de P gegeven door

$$P = -\ln (EW / TW)$$

Waarbij EW staat voor lege putjes en TW voor het totale aantal putjes. Daaruit volgt:

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

Voor de microtiterplaatversie van de MLA worden de mutantfrequenties voor kleine en grote kolonies op gelijke wijze berekend aan de hand van het relevante aantal lege putjes voor kleine en grote kolonies.

Voor de TK6 worden de mutantfrequenties voor kleine en grote kolonies gebaseerd op de vroeg verschijnende en laat verschijnende mutanten.

B.68 IN-VITROTESTMETHODE MET KORTE BLOOTSTELLING VOOR DE IDENTIFICATIE VAN i) CHEMISCHE STOFFEN DIE ERNSTIG OOGLETSEL VEROORZAKEN, EN ii) CHEMISCHE STOFFEN WAARVOOR CLASSIFICATIE VOOR OOGIRRITATIE OF ERNSTIG OOGLETSEL NIET NODIG IS

INLEIDING

1. Deze testmethode (TM) is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 491 (2017) van de OESO. De testmethode met korte blootstelling (Short Time Exposure, STE) is een in-vitromethode die onder bepaalde voorwaarden en binnen specifieke beperkingen kan worden gebruikt voor de gevarenindeling en etikettering van chemische stoffen (stoffen en mengsels) die ernstig oogletsel veroorzaken, en chemische stoffen waarvoor classificatie voor ernstig oogletsel of oogirritatie niet nodig is, zoals gedefinieerd door het mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, GHS) van de Verenigde Naties (VN) (1) en Verordening (EU) nr. 1272/2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels (CLP-verordening)[1].

2. Jarenlang is voor het beoordelen van het mogelijke gevaar van chemische stoffen voor de ogen voornamelijk een in-vivo-oogtest bij konijnen (TM B.5 (8), gelijkwaardig aan TG 405 van de OESO) gebruikt. Naar algemene verwachting zal er in de nabije toekomst geen in-vitro-alternatief komen dat op zichzelf de in-vivo-oogtest bij konijnen volledig zal kunnen vervangen om voorspellingen te doen voor het volledige responsbereik voor ernstig oogletsel of oogirritatie voor verschillende klassen chemische stoffen. Strategische combinaties van alternatieve testmethoden die worden gebruikt in een (trapsgewijze) teststrategie, kunnen de oogtest bij konijnen mogelijk echter wel volledig vervangen (2). De top-downbenadering is bedoeld voor het testen van chemische stoffen waarvan op basis van bestaande informatie verwacht kan worden dat ze een hoog irritatiepotentieel hebben of ernstig oogletsel veroorzaken. Anderzijds is de bottom-upbenadering bedoeld voor het testen van chemische stoffen waarvan op basis van bestaande informatie verwacht kan worden dat ze onvoldoende oogirritatie zullen veroorzaken om classificatie noodzakelijk te maken. Hoewel de STE-testmethode niet geacht wordt de in-vivo-oogtest bij konijnen

[1] Verordening (EG) nr. 1272/2008 van het Europees Parlement en de Raad van 16 december 2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels, tot wijziging en intrekking van de Richtlijnen 67/548/EEG en 1999/45/EG en tot wijziging van Verordening (EG) nr. 1907/2006, PB L 353 van 31.12.2008, blz. 1.

volledig te kunnen vervangen, is zij wel bruikbaar als onderdeel van een trapsgewijze teststrategie voor classificatie en etikettering volgens de regelgeving, zoals de top-down-/bottom-upbenadering, voor het identificeren zonder verdere tests van i) chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken (VN-GHS/CLP-categorie 1), en ii) chemische stoffen (uitgezonderd sterk vluchtige stoffen en alle vaste chemische stoffen, behalve oppervlakteactieve stoffen) waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is (VN-GHS/CLP Geen categorie) (1) (2). Voor een chemische stof waarvoor met de STE-testmethode niet wordt voorspeld dat deze ernstig oogletsel veroorzaakt (VN-GHS/CLP-categorie 1), en die evenmin als VN-GHS/CLP Geen categorie (veroorzaakt geen ernstig oogletsel of oogirritatie) wordt aangemerkt, moeten echter aanvullende tests worden uitgevoerd om tot een definitieve classificatie te komen. Bovendien moeten, voordat de STE-testmethode wordt gebruikt in een bottom-upbenadering volgens andere classificatiesystemen dan het VN-GHS/CLP-systeem, de toepasselijke regelgevingsinstanties worden geraadpleegd. Bij de keuze van de meest geschikte testmethode en het gebruik van deze testmethode moet de OESO-leidraad voor een geïntegreerde test- en beoordelingsbenadering (Integrated Approach on Testing and Assessment, IATA) voor ernstig oogletsel en oogirritatie worden gevolgd (14).

3. Deze testmethode is bedoeld om de procedures te beschrijven om het mogelijke gevaar van een teststof voor de ogen te beoordelen op basis van het vermogen van deze chemische stof om cytotoxiciteit te veroorzaken in de STE-testmethode. Het cytotoxische effect van chemische stoffen op de hoornvliesepitheelcellen is een belangrijk werkingsmechanisme (mode of action, MOA) dat tot schade aan het corneale epitheel en oogirritatie leidt. De levensvatbaarheid van cellen in de STE-testmethode wordt bepaald door kwantitatieve meting, na extractie uit de cellen, van blauw formazanzout dat door de levende cellen wordt geproduceerd door enzymatische omzetting van de vitale kleurstof MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromide), die ook bekend is onder de naam thiazolylblauw tetrazoliumbromide (3). De verkregen cellevensvatbaarheid wordt vergeleken met de oplosmiddelcontrole (relatieve levensvatbaarheid) en gebruikt om het mogelijke gevaar van de teststof voor de ogen te bepalen. Een teststof wordt ingedeeld als VN-GHS/CLP-categorie 1, wanneer zowel de concentratie van 5 % als die van 0,05 % tot een cellevensvatbaarheid leiden die gelijk is aan of lager dan (≤) 70 %. Anderzijds wordt voorspeld dat een teststof moet worden ingedeeld als VN-GHS/CLP Geen categorie, wanneer zowel de concentratie van 5 % als die van 0,05 % tot een cellevensvatbaarheid van meer dan (>) 70 % leiden.

4. De term "teststof" wordt in deze teststof gebruikt om te verwijzen naar datgene dat wordt getest en houdt geen verband met de toepasselijkheid van de STE-testmethode

op het testen van stoffen en/of mengsels. Definities worden gegeven in het aanhangsel.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

5. Deze testmethode is gebaseerd op een protocol dat is ontwikkeld door Kao Corporation (4). Dit protocol is aan twee verschillende valideringsstudies onderworpen: een studie door de valideringscommissie van de Japanse Vereniging voor alternatieven voor dierproeven (JSAAE) (5) en een studie door het Japans Centrum voor de validering van alternatieve methoden (JaCVAM) (6). Op basis van de verslagen van de valideringsstudies en de Background Review Documents voor de testmethode heeft NICEATM/ICCVAM een onafhankelijke beoordeling door vakgenoten uitgevoerd (7).

6. Bij gebruik van de STE-testmethode om chemische stoffen (stoffen en mengsels) te identificeren die ernstig oogletsel veroorzaken (VN-GHS/CLP-categorie 1 (1)), is uit de gegevens die werden verkregen voor 125 chemische stoffen (zowel stoffen als mengsels), een algemene nauwkeurigheid gebleken van 83 % (104/125), een percentage vals-positieve uitslagen van 1 % (1/86) en een percentage vals-negatieve uitslagen van 51 % (20/39) in vergelijking met de in-vivo-oogtest bij konijnen (7). Het verkregen percentage vals-negatieve uitslagen is niet kritiek in deze context, omdat alle teststoffen die een cellevensvatbaarheid van ≤ 70 % bij een concentratie van 5 % en > 70 % bij een concentratie van 0,05 % veroorzaken, vervolgens worden getest met andere afdoend gevalideerde in-vitrotestmethoden, of als laatste optie met de in-vivo-oogtest bij konijnen, afhankelijk van de wettelijke voorschriften en volgens de huidige aanbevolen sequentiële teststrategie en op bewijskracht gebaseerde aanpakken (1) (8). Er werden voornamelijk stoffen die bestaan uit één component getest, hoewel er ook een beperkte hoeveelheid gegevens beschikbaar is over het testen van mengsels. De testmethode is vanuit technisch oogpunt evenwel toepasbaar voor het testen van stoffen die uit meerdere componenten bestaan en van mengsels. Voordat deze testmethode wordt gebruikt op een mengsel om gegevens te genereren voor een beoogd regelgevingsdoel, moet echter worden nagegaan of, en zo ja, waarom deze methode betrouwbare resultaten oplevert voor dat doel. Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is. De STE-testmethode vertoont geen andere specifieke tekortkomingen wanneer zij wordt gebruikt om teststoffen te identificeren als VN-GHS/CLP-categorie 1. Onderzoekers zouden kunnen overwegen deze testmethode voor teststoffen te gebruiken, waarbij een cellevensvatbaarheid ≤ 70 % bij zowel een concentratie van 5 % en een concentratie van 0,05 % moet worden geaccepteerd als indicatief voor een respons die ernstig oogletsel veroorzaakt waardoor de teststof zonder verdere tests moet worden ingedeeld in VN-GHS/CLP-categorie 1.

7. Bij gebruik van de STE-testmethode om chemische stoffen (stoffen en mengsels) te identificeren waarvoor classificatie voor oogirritatie en ernstig oogletsel niet nodig is (d.w.z. VN-GHS/CLP Geen categorie), is uit de gegevens die werden verkregen voor 130 chemische stoffen (zowel stoffen als mengsels), een algemene nauwkeurigheid gebleken van 85 % (110/130), een percentage vals-negatieve uitslagen van 12 % (9/73) en een percentage vals-positieve uitslagen van 19 % (11/57), vergeleken met de in-vivo-oogtest bij konijnen (7). Als sterk vluchtige en vaste stoffen, behalve oppervlakteactieve stoffen, worden uitgesloten van de gegevensset, verbeteren de algemene nauwkeurigheid tot 90 % (92/102), het percentage vals-negatieve uitslagen tot 2 % (1/54) en het percentage vals-positieve uitslagen tot 19 % (9/48) (7). De mogelijke tekortkomingen van de STE-testmethode, wanneer zij wordt gebruikt om teststoffen te identificeren waarvoor classificatie voor oogirritatie en ernstig oogletsel niet nodig is (VN-GHS/CLP Geen categorie), zijn daarom een hoog percentage vals-negatieve uitslagen voor i) sterk vluchtige stoffen met een dampdruk van meer dan 6 kPa en ii) vaste chemische stoffen (stoffen en mengsels) behalve oppervlakteactieve stoffen en mengsels die enkel uit oppervlakteactieve stoffen bestaan. Dergelijke chemische stoffen worden van het toepassingsgebied van de STE-testmethode uitgesloten (7).

8. Behalve de chemische stoffen die worden genoemd in de punten 6 en 7, bevat de gegevensset die met de STE is gegenereerd, ook gegevens uit eigen laboratorium voor 40 mengsels. Deze hadden, vergeleken met de in-vivo-Draize-oogtest, een algemene nauwkeurigheid van 88 % (35/40), een percentage vals-positieve uitslagen van 50 % (5/10) en een percentage vals-negatieve uitslagen van 0 % (0/30) voor voorspellingen voor mengsels waarvoor classificatie volgens de VN-GHS/CLP-classificatiesystemen niet nodig is (9). De STE-testmethode is daarom wel toepasbaar om mengsels te identificeren als VN-GHS/CLP Geen categorie in een bottom-upbenadering met uitzondering van vaste mengsels, tenzij deze enkel uit oppervlakteactieve stoffen bestaan, als uitbreiding van de beperking ervan voor vaste stoffen. Bovendien moeten mengsels die stoffen bevatten met een dampdruk van meer dan 6 kPa, zorgvuldig worden beoordeeld om onderschatting te vermijden. Het gebruik van de testmethode voor deze mengsels moet per geval gerechtvaardigd worden.

9. De STE-testmethode mag niet worden gebruikt om teststoffen te identificeren als VN-GHS/CLP-categorie 2 of VN-GHS-categorie 2A (irriterend voor de ogen) of 2B (licht irriterend voor de ogen), vanwege het aanzienlijke aantal chemische stoffen van VN-GHS/CLP-categorie 1 waarvan het mogelijke gevaar voor de ogen werd onderschat als categorie 2, 2A of 2B en chemische stoffen van VN-GHS/CLP Geen categorie waarvan het mogelijke gevaar voor de ogen werd overschat als categorie 2, 2A of 2B (7). Voor dit doel kan het nodig zijn verdere tests met een andere geschikte methode uit te voeren.

10. De STE-testmethode is geschikt voor teststoffen die opgelost zijn of gedurende ten minste 5 minuten gelijkmatig gesuspendeerd blijven in fysiologische zoutoplossing, 5 % dimethylsulfoxide (DMSO) in zoutoplossing, of minerale olie. De STE-testmethode is niet geschikt voor teststoffen die onoplosbaar zijn of niet gedurende ten minste 5 minuten gelijkmatig gesuspendeerd blijven in fysiologische zoutoplossing, 5 % DMSO in zoutoplossing, of minerale olie. Bij de STE-testmethode kan minerale olie worden gebruikt vanwege de korte duur van de blootstelling. Daarom is de STE-testmethode geschikt om het mogelijke gevaar voor de ogen te voorspellen van teststoffen die onoplosbaar zijn in water (bv. vette alcoholen of ketonen), mits deze mengbaar zijn in ten minste een van de drie hierboven voorgestelde oplosmiddelen (4).

11. De term "teststof" wordt in deze teststof gebruikt om te verwijzen naar datgene dat wordt getest[1], en houdt geen verband met de toepasselijkheid van de STE-testmethode op het testen van stoffen en/of mengsels.

PRINCIPE VAN DE TEST

12. De STE-testmethode is een op cytotoxiciteit gebaseerde in-vitrobepaling die wordt uitgevoerd op een confluente monolaag van cellen van SIRC-cellen (Statens Seruminstitut Rabbit Cornea) die worden gekweekt in een microtiterplaat van polycarbonaat met 96 putjes (4). Na vijf minuten blootstelling aan een teststof wordt de cytotoxiciteit kwantitatief gemeten als de relatieve cellevensvatbaarheid van SIRC-cellen met behulp van de MTT-test (4). De afgenomen cellevensvatbaarheid wordt gebruikt voor het voorspellen van mogelijke schadelijke effecten die tot oogschade kunnen leiden.

13. Er is beschreven dat wanneer een oplossing in het oog van een konijn wordt gedruppeld, 80 % ervan binnen drie à vier minuten via de conjunctivaalzak wordt uitgescheiden, terwijl van een oplossing die in een mensenoog wordt gedruppeld, meer dan 80 % binnen een à twee minuten wordt uitgescheiden (10). Met de STE-testmethode wordt gepoogd deze blootstellingstijden te benaderen en wordt de cytotoxiciteit als eindpunt gebruikt voor de beoordeling van de mate van beschadiging van SIRC-cellen na vijf minuten blootstelling aan de teststof.

[1] In juni 2013 heeft de gezamenlijke vergadering besloten dat er in nieuwe en bijgewerkte testmethoden waar mogelijk consequenter gebruikgemaakt moet worden van de term "teststof" om te beschrijven wat er getest wordt.

AANTONING VAN BEKWAAMHEID

14. Voordat de STE-testmethode die in deze testmethode wordt beschreven, routinematig wordt gebruikt, moeten laboratoria hun technische bekwaamheid aantonen door een correcte indeling van de elf in tabel 1 aanbevolen stoffen. Deze stoffen zijn zodanig geselecteerd dat ze het volledige responsbereik voor ernstig oogletsel of oogirritatie vertegenwoordigen op basis van de resultaten van de in-vivo-oogtest bij konijnen (TG 405) en het VN-GHS/CLP-classificatiesysteem (1). Andere selectiecriteria waren onder meer dat de stoffen in de handel verkrijgbaar zijn, dat er in-vivoreferentiegegevens van zeer goede kwaliteit beschikbaar zijn en dat er met de STE-testmethode gegenereerde in-vitrogegevens van zeer goede kwaliteit beschikbaar zijn (3). Wanneer een stof uit de lijst niet beschikbaar is of indien zulks gerechtvaardigd is, mag een andere stof waarvoor voldoende in-vivo- en in-vitroreferentiegegevens beschikbaar zijn, worden gebruikt, mits dezelfde criteria als hier beschreven worden toegepast.

Tabel 1: Lijst van stoffen voor bekwaamheidstoetsing

Stof	**CAS RN**	**Chemische klasse[1]**	**Fysische toestand**	**VN-GHS/CLP-cat. in vivo[2]**	**Oplos-middel in STE-test**	**VN-GHS/CLP-cat. STE**
Benzalkonium-chloride (10 %, waterig)	8001-54-5	Onium-verbinding	Vloeistof	Categorie 1	Zout-oplossing	Categorie 1
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Ether	Vloeistof	Categorie 1	Zout-oplossing	Categorie 1
Acid Red 92	18472-87-2	Hetero-cyclische verbinding; broom-verbinding; chloor-verbinding	Vaste stof	Categorie 1	Zout-oplossing	Categorie 1
Natriumhydroxide	1310-73-2	Alkali; Anorganische stof	Vaste stof	Categorie 1[3]	Zout-oplossing	Categorie 1
Butyrolacton	96-48-0	Lacton; hetero-cyclische verbinding	Vloeistof	Categorie 2A (Categorie 2 in CLP)	Zout-oplossing	Er kan geen voor-spelling worden gedaan
Octaan-1-ol	111-87-5	Alcohol	Vloeistof	Categorie 2A/B[4] (Categorie 2 in CLP)	Minerale olie	Er kan geen voor-spelling worden gedaan
Cyclopentanol	96-41-3	Alcohol; Koolwater-stof, cyclisch	Vloeistof	Categorie 2A/B[5] (Categorie 2 in	Zout-oplossing	Er kan geen voor-spelling

				CLP)		worden gedaan
2-Ethoxyethylacetaat	111-15-9	Alcohol; Ether	Vloeistof	Geen categorie	Zout-oplossing	Geen categorie
Dodecaan	112-40-3	Koolwater-stof, acyclisch	Vloeistof	Geen categorie	Minerale olie	Geen categorie
Methylisobutyl-keton	108-10-1	Keton	Vloeistof	Geen categorie	Minerale olie	Geen categorie
N,*N*-Dimethylguanidine-sulfaat	598-65-2	Amidine; Zwavel-verbinding	Vaste stof	Geen categorie	Zout-oplossing	Geen categorie

Afkortingen: CAS RN = registratienummer van de Chemical Abstracts Service

[1]Scheikundige klassen werden toegekend op basis van informatie uit eerdere publicaties van het NICEATM en, indien niet beschikbaar, aan de hand van de Medical Subject Headings (MeSH®) van de Amerikaanse National Library of Medicine (via ChemIDplus® [National Library of Medicine], beschikbaar op http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/) en structuurbepalingen door het NICEATM.

[2]Gebaseerd op de resultaten van de in-vivo-oogtest op konijnen (OESO TG 405) en aan de hand van het VN-GHS/CLP (1).

[3]De indeling in categorie 1 is gebaseerd op het potentieel voor huidcorrosie van 100 % natriumhydroxide (opgenomen in de lijst als chemische stof met potentieel voor huidcorrosie in OESO TG 435) en het criterium voor VN-GHS/CLP-categorie 1 (1).

[4]Indeling in categorie 2A of 2B hangt af van de interpretatie van het VN-GHS-criterium voor het onderscheiden van deze twee categorieën, d.w.z. 2 van de 6 versus 4 van de 6 dieren met effecten op dag 7 nodig voor indeling in categorie 2A. In de in-vivogegevensset werden 2 onderzoeken opgenomen met elk 3 dieren. In het ene onderzoek vertoonden twee van de drie dieren op dag 7 effecten die indeling in categorie 2A rechtvaardigen, terwijl in het andere onderzoek alle eindpunten voor alle drie de dieren op dag 7 hersteld waren, hetgeen indeling in categorie 2B rechtvaardigt (12).

[5]Indeling in categorie 2A of 2B hangt af van de interpretatie van het VN-GHS-criterium voor het onderscheiden van deze twee categorieën, d.w.z. 1 van de 3 versus 2 van de 3 dieren met effecten op dag 7 nodig voor indeling in categorie 2A. Het in-vivo-onderzoek omvatte 3 dieren. Alle eindpunten behalve vertroebeling van het hoornvlies en roodheid van de conjunctiva in één dier herstelden tot een score van nul op dag 7 of eerder. Het ene dier dat op dag 7 niet volledig was hersteld, had een score van 1 voor vertroebeling van het hoornvlies en een score van 1 voor de roodheid van de conjunctiva (op dag 7), die beide volledig waren hersteld op dag 14 (11).

PROCEDURE

Bereiding van de monolaag van cellen

15. De STE-testmethode moet worden uitgevoerd met de SIRC-cellijn van konijnenhoornvliescellen. Aanbevolen wordt om SIRC-cellen te betrekken van een goed gekwalificeerde celbank, zoals de American Type Culture Collection CCL60.

16. SIRC-cellen worden gekweekt bij 37 °C in een vochtige atmosfeer met 5 % CO_2, in een kweekfles met een kweekmedium dat bestaat uit Eagle's Minimum Essential Medium (MEM), aangevuld met 10 % foetaal runderserum (FBS), 2 mM L-glutamine, 50-100 eenheden/ml penicilline en 50-100 µg/ml streptomycine. Cellen die confluent zijn geworden in de kweekfles, moeten worden gescheiden met een trypsine-ethyleendiaminetetraazijnzuur-oplossing, al dan niet met behulp van een

celschraper. De cellen worden vermeerderd (bv. 2 tot 3 passages) in een kweekfles alvorens te worden gebruikt voor routinetests en mogen na ontdooiing niet meer dan 25 passages ondergaan.

17. Cellen die gereed zijn voor gebruik in de STE-test, worden vervolgens bereid met een passende dichtheid en geënt in microtiterplaten met 96 putjes. De aanbevolen celdichtheid bij het enten is $6{,}0 \times 10^3$ cellen per putje, wanneer de cellen vier dagen na het enten worden gebruikt, of $3{,}0 \times 10^3$ cellen per putje, wanneer de cellen vijf dagen na het enten worden gebruikt, in een kweekvolume van 200 µl. Cellen die worden gebruikt voor de STE-test en die met de passende dichtheid worden geënt in een kweekmedium, bereiken op het moment van testen, d.w.z. vier of vijf dagen na het enten, een confluentie van meer dan 80 %.

Het aanbrengen van de teststoffen en de controlestoffen

18. Het eerstekeus-oplosmiddel voor het oplossen of suspenderen van teststoffen is fysiologische zoutoplossing. Als de teststof een lage oplosbaarheid heeft of niet opgelost of gedurende ten minste vijf minuten gelijkmatig gesuspendeerd kan worden in zoutoplossing, wordt als tweedekeus-oplosmiddel 5 % DMSO (CAS RN 67-68-5) in zoutoplossing gebruikt. Voor teststoffen die niet opgelost of gedurende ten minste vijf minuten gelijkmatig gesuspendeerd kunnen worden in zoutoplossing of 5 % DMSO in zoutoplossing, wordt minerale olie (CAS RN 8042-47-5) gebruikt als derdekeus-oplosmiddel.

19. Teststoffen worden opgelost of gelijkmatig gesuspendeerd in het geselecteerde oplosmiddel in een concentratie van 5 % (w/w) en verder serieel verdund met een factor 10 tot 0,5 % en 0,05 %. Elke teststof wordt getest in zowel een concentratie van 5 % als een concentratie van 0,05 %. De cellen die zijn gekweekt in een microtiterplaat met 96 putjes, worden gedurende vijf minuten bij kamertemperatuur blootgesteld aan 200 µl/putje van de teststofoplossing (of teststofsuspensie) in een concentratie van hetzij 5 %, hetzij 0,05 %. De teststoffen (stoffen die uit één component bestaan, of stoffen die uit meerdere componenten bestaan, of mengsels) worden als zuivere stoffen beschouwd en opgelost of gesuspendeerd volgens deze methode, ongeacht de zuiverheidsgraad.

20. Het in punt 16 beschreven kweekmedium wordt in elke plaat van elke herhaalde bepaling als mediumcontrole gebruikt. Bovendien worden de cellen eveneens in elke plaat van elke herhaalde bepaling aan oplosmiddelcontrolemonsters blootgesteld. Van de in punt 18 vermelde oplosmiddelen is bevestigd dat ze geen negatieve invloed hebben op de levensvatbaarheid van SIRC-cellen.

21. In de STE-testmethode wordt in elke plaat van elke herhaalde bepaling 0,01 % natriumlaurylsulfaat (SLS) in zoutoplossing als positieve controle gebruikt. Om de

cellevensvatbaarheid van de positieve controle te berekenen, moet elke plaat van elke herhaalde bepaling ook een oplosmiddelcontrole van zoutoplossing bevatten.

22. Om de compensatie voor de optische dichtheid te bepalen is ook een blanco nodig. Deze moet worden uitgevoerd met putjes die alleen fosfaatgebufferde zoutoplossing bevatten, maar geen calcium en magnesium (PBS-) of cellen.

23. Elk monster (teststof in 5 % en 0,05 %, mediumcontrole, oplosmiddelcontrole en positieve controle) moet in elke herhaalde bepaling in drievoud worden getest door de cellen gedurende vijf minuten bij kamertemperatuur bloot te stellen aan 200 µl van de betreffende test- of controlestof.

24. IJkstoffen zijn nuttig voor de beoordeling van potentiële oogirritatie bij onbekende chemische stoffen uit een specifieke chemische klasse of productklasse of voor de beoordeling van potentiële relatieve irritatie van een voor het oog irriterende stof binnen een reeks van irritatieresponsen.

Meting van de cellevensvatbaarheid

25. Na de blootstelling worden de cellen tweemaal gewassen met 200 µl PBS en wordt er 200 µl MTT-oplossing (0,5 mg MTT/ml kweekmedium) toegevoegd. Na een reactietijd van twee uur in een incubator (37 ºC, 5 % CO_2) wordt de MTT-oplossing gedecanteerd, wordt het MTT-formazan geëxtraheerd met 200 µl 0,04 N zoutzuur-isopropanol gedurende 60 minuten in een donkere kamer bij kamertemperatuur en wordt met een plaatlezer de extinctie van de MTT-formazanoplossing bij 570 nm gemeten. Interferentie van teststoffen met de MTT-test (door kleurstoffen of rechtstreeks MTT reducerende stoffen) treedt alleen op als er na het wassen (tussen blootstelling en meting) een significante hoeveelheid teststof in het testsysteem achterblijft, hetgeen wel het geval is met 3D-gereconstrueerd menselijk hoornvlies of gereconstrueerde humane epidermisweefsels, maar niet relevant is voor de 2D-celculturen die voor de STE-testmethode worden gebruikt.

Interpretatie van de resultaten en voorspellingsmodel

26. De waarden voor de optische dichtheid (OD) die voor elke teststof worden verkregen, worden vervolgens gebruikt voor het berekenen van de cellevensvatbaarheid in vergelijking met de oplosmiddelcontrole, die op 100 % wordt gesteld. De relatieve cellevensvatbaarheid wordt uitgedrukt als een percentage en verkregen door de OD van de teststof te delen door de OD van de oplosmiddelcontrole, nadat van beide waarden de OD van de blanco is afgetrokken.

$$Cellevensvatbaarheid\ (\%) = \frac{(OD_{570}\ teststof) - (OD_{570}\ blanco)}{(OD_{570}\ oplosmiddelcontrole) - (OD_{570}\ blanco)} \times 100$$

Evenzo wordt de relatieve cellevensvatbaarheid van elke oplosmiddelcontrole uitgedrukt als een percentage en verkregen door de OD van elke oplosmiddelcontrole te delen door de OD van de mediumcontrole, nadat van beide waarden de OD van de blanco is afgetrokken.

27. Er moeten drie onafhankelijke herhaalde bepalingen worden gedaan, elk met drie duploputjes (d.w.z. n=9). Aan de hand van het meetkundig gemiddelde van de drie putjes voor elke teststof en elke oplosmiddelcontrole in elke onafhankelijke herhaling wordt het meetkundige gemiddelde van de relatieve cellevensvatbaarheid berekend. Het uiteindelijke meetkundige gemiddelde van de cellevensvatbaarheid wordt berekend op basis van de drie onafhankelijke herhalingen.

28. De drempelwaarden voor de cellevensvatbaarheid om teststoffen te identificeren als chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken (VN-GHS/CLP-categorie 1), en teststoffen waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is (VN-GHS/CLP Geen categorie), worden hieronder gegeven.

Tabel 2: Voorspellingsmodel van de STE-testmethode

Cellevensvatbaarheid:		**VN-GHS/CLP-classificatie**	**Toepassing**
Bij 5 %	**Bij 0,05 %**		
> 70 %	> 70 %	Geen categorie	Stoffen en mengsels, met uitzondering van: i) sterk vluchtige stoffen met een dampdruk van meer dan 6 kPa[1] en ii) vaste chemische stoffen (stoffen en mengsels) behalve oppervlakteactieve stoffen en mengsels die enkel uit oppervlakteactieve stoffen bestaan
≤ 70 %	> 70 %	Er kan geen voorspelling worden gedaan	Niet van toepassing
≤ 70 %	≤ 70 %	Categorie 1	Stoffen en mengsels[2]

[1] Mengsels die stoffen bevatten met een dampdruk van meer dan 6 kPa, moeten zorgvuldig worden beoordeeld om onderschatting te vermijden. Het gebruik van de testmethode voor deze mengsels moet per geval gerechtvaardigd worden.

[2] Op basis van resultaten die zijn verkregen met stoffen die uit één component bestaan, hoewel er ook een beperkte hoeveelheid gegevens is over het testen van mengsels. De testmethode is vanuit technisch oogpunt evenwel toepasbaar voor het testen van stoffen die uit meerdere componenten bestaan en van mengsels. Voordat deze testmethode wordt gebruikt op een mengsel om gegevens te genereren voor een beoogd regelgevingsdoel, moet worden nagegaan of, en zo ja, waarom deze methode betrouwbare resultaten oplevert voor dat doel. Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is.

Aanvaardbaarheidscriteria

29. De testresultaten worden aanvaardbaar geacht wanneer aan alle onderstaande criteria wordt voldaan:

a) de OD van de mediumcontrole (blootgesteld aan kweekmedium) moet, na aftrek van de blanco-OD, 0,3 of hoger zijn;

b) de levensvatbaarheid van de oplosmiddelcontrole moet 80 % of hoger zijn in ten opzichte van de mediumcontrole. Als er in elke herhaling meerdere oplosmiddelcontroles worden gebruikt, worden de resultaten voor de teststoffen die met die oplosmiddelen zijn getest, aanvaardbaar geacht als elk van deze controles een cellevensvatbaarheid van meer dan 80 % laat zien;

c) de cellevensvatbaarheid die wordt verkregen met de positieve controle (0,01 % SLS), moet binnen twee standaarddeviaties van het historische gemiddelde liggen. De bovenste en onderste aanvaardbaarheidsgrenzen voor de positieve controle moeten regelmatig worden bijgewerkt, d.w.z. eens in de drie maanden of elke keer dat een aanvaardbare test wordt uitgevoerd in laboratoria waar de tests niet regelmatig (d.w.z. minder dan eens per maand) worden uitgevoerd. Wanneer een laboratorium een onvoldoende aantal experimenten voltooit om een statistisch robuuste verdeling van positieve controles vast te stellen, is het aanvaardbaar om de bovenste en onderste aanvaardbaarheidsgrenzen te gebruiken die door de ontwikkelaar van de methode zijn vastgesteld, d.w.z. 21,1 % en 62,3 % volgens zijn historische laboratoriumgegevens, terwijl er tijdens de eerste routinetests een verdeling wordt opgebouwd voor het eigen laboratorium;

d) de standaarddeviatie van de uiteindelijke cellevensvatbaarheid die wordt afgeleid uit de drie onafhankelijke herhalingen, moet kleiner zijn dan 15 % voor zowel de concentratie van 5 % als die van 0,05 % van de teststof.

Als aan een of meer van deze criteria niet wordt voldaan, moeten de resultaten worden verworpen en moeten drie nieuwe onafhankelijke herhalingen worden uitgevoerd.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

30. In het verslag moeten de gegevens voor elk afzonderlijk putje (bv. de waarden voor de cellevensvatbaarheid) van elke herhaling, evenals het algemene gemiddelde, de SD en de indeling worden opgenomen.

Testverslag

31. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof en controlestoffen

- stof die uit één component bestaat: chemische identificatie, zoals IUPAC- of CAS-na(a)m(en), CAS-registratienummer(s), SMILES- of InChI-code(s), structuurformules en/of andere identificatiemiddelen;

- stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB en mengsel: karakterisering, voor zover mogelijk aan de hand van bv. chemische identiteit (zie hierboven), zuiverheid, kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen (zie hierboven) van de bestanddelen, voor zover beschikbaar;
- fysische toestand, vluchtigheid, pH, logP, molecuulgewicht, chemische klassen en aanvullende fysisch-chemische eigenschappen die relevant zijn voor het uitvoeren van het onderzoek, voor zover beschikbaar;
- zuiverheid, chemische naam van onzuiverheden waar passend en praktisch haalbaar enz.;
- behandeling voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);
- bewaaromstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar.

Voorwaarden en procedures voor de testmethode

- naam en adres van de opdrachtgever, testinstallatie en de onderzoeksleider;
- een beschrijving van de gebruikte testmethode;
- de gebruikte cellijn, de herkomst ervan, het aantal passages en de confluentie van de voor het testen gebruikte cellen;
- gedetailleerde informatie over de gebruikte testprocedure;
- het aantal gebruikte herhalingen en duplo's;
- de gehanteerde concentraties van de teststof (indien verschillend van de aanbevolen concentraties);
- motivering van de keuze van het oplosmiddel voor elke teststof;
- duur van de blootstelling aan de teststof (indien verschillend van de aanbevolen tijd);
- een beschrijving van eventuele wijzigingen in de testprocedure;
- een beschrijving van de gebruikte beoordelings- en beslissingscriteria;
- een verwijzing naar het historische gemiddelde en de bijbehorende standaarddeviatie (SD) voor de positieve controle:

- aantoning dat het laboratorium bekwaam is om de testmethode toe te passen (bv. door de stoffen voor bekwaamheidstoetsing te testen) of aantoning dat de prestaties van de testmethode in de loop van de tijd kunnen worden gereproduceerd.

Resultaten

- voor elke teststof en controlestof, en elke geteste concentratie, moeten de afzonderlijke OD-waarden per duploputje, het rekenkundig gemiddelde van de OD-

waarden voor elke onafhankelijke herhaling, de procentuele cellevensvatbaarheid voor elke onafhankelijke herhaling en het uiteindelijke rekenkundige gemiddelde van de procentuele cellevensvatbaarheid en de bijbehorende SD over drie herhalingen in een tabel worden weergegeven;

- resultaten voor medium-, oplosmiddel- en positieve controle waaruit blijkt dat het onderzoek aan de aanvaardbaarheidscriteria voldoet;
- een beschrijving van andere waargenomen effecten;
- de uiteindelijk uit de resultaten afgeleide indeling met vermelding van het gebruikte voorspellingsmodel/de gehanteerde beslissingscriteria.

Bespreking van de resultaten

Conclusies

LITERATUUR

(1) Verenigde Naties (VN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Genève: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Beschikbaar op: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

(3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(4) Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22,760-770.

(5) Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25,796-809.

(6) Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, pp.1855-1869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Beschikbaar op: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Hoofdstuk B.5 van deze bijlage, Acute oogirritatie/-corrosie.

(9) Saito K, *et al*. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.

(10) Mikkelson TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm*. Sci.1648-1653.

(11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Brussels, Belgium.

(12) Gautheron P, *et al*. (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. Fundam Appl *Toxicol.* 18, 442-449.

(13) OESO (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(14) OESO (2017). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Serious Eye Damage and Eye Irritation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

Aanhangsel

DEFINITIES

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een testmethode, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden uitgevoerd. De betrouwbaarheid wordt beoordeeld door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid en intralaboratoriumherhaalbaarheid (13).

Bottom-upbenadering: een trapsgewijze benadering die wordt gebruikt voor een teststof waarvan wordt vermoed dat classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is, die begint met het onderscheiden van chemische stoffen waarvoor classificatie niet nodig is (negatief resultaat) van andere chemische stoffen (positief resultaat).

Chemische stof: een stof of een mengsel.

Ernstig oogletsel: weefselbeschadiging in het oog of een ernstige fysieke gezichtsvermindering na het aanbrengen van een teststof op het oppervlak aan de voorzijde van het oog, die binnen 21 dagen na het aanbrengen niet volledig omkeerbaar is. Verwisselbaar met "Omkeerbare effecten op ogen" en met "VN-GHS/CLP-categorie 1".

Gevaar: inherente eigenschap van een agens of situatie die nadelige effecten kan veroorzaken als een organisme, systeem of (sub)populatie aan dit agens wordt blootgesteld.

Gevoeligheid: het percentage van alle positieve/actieve chemische stoffen dat door middel van de testmethode correct wordt ingedeeld. Dit is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert en is een belangrijke factor voor de beoordeling van de relevantie van een testmethode (10).

GHS (mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen van de Verenigde Naties (VN)): een systeem voor de indeling van chemische producten (stoffen en mengsels) op basis van gestandaardiseerde soorten en niveaus van gevaren van fysische aard en gevaren voor de gezondheid en het milieu, en dat de desbetreffende voorlichtingselementen bepaalt, zoals pictogrammen, signaalwoorden, gevarenaanduidingen, voorzorgsmaatregelen en veiligheidsinformatiebladen, waarmee informatie over de schadelijke effecten van de stoffen kenbaar worden gemaakt teneinde mensen (waaronder werkgevers, werknemers, transporteurs, consumenten en spoedhulpverleners) en het milieu te beschermen (1).

IJkstof: een stof die wordt gebruikt als norm voor vergelijking met een teststof. Een ijkstof moet de volgende eigenschappen hebben: i) (een) constante en betrouwbare bron(nen); ii) een structurele en functionele gelijkenis met de klasse stoffen die getest

wordt; iii) hun fysische/chemische kenmerken moeten bekend zijn; iv) ondersteunende gegevens over bekende effecten en v) een bekende werkzaamheid binnen het bereik van de gewenste respons.

Mediumcontrole: een onbehandeld monster dat alle componenten bevat van een testsysteem. Dit monster wordt samen met de met de teststof behandelde monsters en andere controlemonsters verwerkt om te bepalen of het oplosmiddel interageert met het testsysteem.

Mengsel: een mengsel of oplossing bestaande uit twee of meer stoffen.

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromide; thiazolylblauw tetrazoliumbromide.

Nauwkeurigheid: de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de testmethode en erkende referentiewaarden. Dit is een maat voor de prestaties van de testmethode en één aspect van relevantie. Deze term en de term "concordantie", waaronder het percentage correcte uitkomsten van een testmethode wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt (13).

OD: optische dichtheid.

Oogirritatie: veranderingen in het oog na het aanbrengen van een teststof op het oppervlak aan de voorzijde van het oog, die binnen 21 dagen na het aanbrengen volledig omkeerbaar zijn. Verwisselbaar met "Omkeerbare effecten op ogen" en met "VN-GHS/CLP-categorie 2".

Oplosmiddel-/vehiculumcontrole: een onbehandeld monster dat alle componenten bevat van een testsysteem, met inbegrip van het oplosmiddel of vehiculum, dat tezamen met de met de teststof behandelde monsters en andere controlemonsters verwerkt wordt om de referentierespons voor de monsters die behandeld werden met de in hetzelfde oplosmiddel of vehiculum opgeloste teststof vast te stellen. Als dit monster getest wordt met een tegelijkertijd gemeten mediumcontrole, toont het ook aan of het oplosmiddel of vehiculum met het testsysteem interageert.

Oppervlakteactieve stof: ook "agens dat inwerkt op de oppervlakte" genoemd. Dit is een chemische stof, zoals een detergens, die de oppervlaktespanning van een vloeistof kan verlagen en het zo mogelijk maakt dat de vloeistof gaat schuimen of in vaste stoffen doordringt; ook bekend als een bevochtigingsmiddel.

Positieve controle: een monster met alle bestanddelen van een testsysteem dat met een stof behandeld werd waarvan bekend is dat deze een positieve respons opwekt. Om te verzekeren dat variabiliteit in de positievecontrolerespons doorheen de tijd kan worden beoordeeld, mag de grootte van de positieve respons niet buitensporig zijn.

Percentage vals-negatieve uitslagen: het percentage van alle positieve chemische stoffen dat door een testmethode onterecht als negatief wordt geïdentificeerd. Het is één indicator van de prestaties van de testmethode.

Percentage vals-positieve uitslagen: het percentage van alle negatieve chemische stoffen dat door een testmethode onterecht als positief wordt geïdentificeerd. Het is één indicator van de prestaties van de testmethode.

Relevantie: beschrijving van het verband van de test met het te onderzoeken effect en of de test betekenis heeft en nuttig is voor een bepaald doel. Het is de mate waarin de test het te onderzoeken biologische effect correct meet of voorspelt. Relevantie omvat een beoordeling van de nauwkeurigheid (concordantie) van een testmethode (10).

Specificiteit: het percentage van alle negatieve/inactieve chemische stoffen dat door de test correct wordt ingedeeld. Dit is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert en is een belangrijke factor voor de beoordeling van de relevantie van een testmethode (13).

Stof: een chemisch element en de verbindingen ervan, zoals zij voorkomen in natuurlijke toestand of bij de productie ontstaan, met inbegrip van alle additieven die nodig zijn voor het behoud van de stabiliteit ervan en alle onzuiverheden ten gevolge van het toegepaste procedé, doch met uitzondering van elk oplosmiddel dat kan worden afgescheiden zonder aantasting van de stabiliteit van de stof of wijziging van de samenstelling ervan.

Stof die uit één component bestaat: een stof die wordt gekenmerkt door haar kwantitatieve samenstelling en waarin een hoofdcomponent aanwezig is in een concentratie van ten minste 80 % (w/w).

Stof die uit meerdere componenten bestaat: een stof die wordt gekenmerkt door haar kwantitatieve samenstelling en waarin meer dan één hoofdcomponent aanwezig is in een concentratie van ≥ 10 % (w/w) en < 80 % (w/w). Een stof die uit meerdere componenten bestaat, is het resultaat van een fabricageproces. Het verschil tussen mengsels en stoffen die uit meerdere componenten bestaan, is dat mengsels worden verkregen door twee of meer stoffen zonder chemische reactie met elkaar te vermengen. Een stof die uit meerdere componenten bestaat, is het resultaat van een chemische reactie.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

Top-downbenadering: een trapsgewijze benadering die gebruikt wordt voor een teststof waarvan wordt vermoed dat deze ernstig oogletsel veroorzaakt, die begint met het onderscheiden van chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken (positief resultaat) van andere chemische stoffen (negatief resultaat).

Trapsgewijze teststrategie: een trapsgewijze teststrategie waarbij alle bestaande informatie over een teststof in een bepaalde volgorde wordt herbezien aan de hand van een proces op basis van bewijskracht op elke trap om te bepalen of er voldoende informatie beschikbaar is voor een beslissing tot gevarenclassificatie, vooraleer wordt overgegaan tot de volgende trap. Indien het irritatiepotentieel van een teststof kan worden bepaald op basis van de bestaande informatie, dan zijn bijkomende tests niet vereist. Indien het irritatiepotentieel van een teststof niet kan worden bepaald op basis

van de bestaande informatie, dan wordt een trapsgewijze sequentiële testprocedure op dieren uitgevoerd tot een ondubbelzinnige indeling mogelijk is.

UVCB: stoffen met een onbekende of variabele samenstelling, complexe reactieproducten en biologische materialen.

VN-GHS/CLP-categorie 1: zie "Ernstig oogletsel".

VN-GHS/CLP-categorie 2: zie "Oogirritatie".

VN-GHS/CLP Geen categorie: chemische stoffen die niet worden ingedeeld in VN-GHS/CLP-categorie 1 of 2 (2A of 2B).

B.69 TESTMETHODE MET GERECONSTRUEERD MODEL VAN MENSELIJK HOORNVLIESEPITHEEL VOOR DE IDENTIFICATIE VAN CHEMISCHE STOFFEN WAARVOOR CLASSIFICATIE EN ETIKETTERING VOOR OOGIRRITATIE OF ERNSTIG OOGLETSEL NIET NODIG IS

INLEIDING

1. Deze testmethode (TM) is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 492 (2017) van de OESO. Onder *ernstig oogletsel* wordt verstaan weefselbeschadiging in het oog of een ernstige fysieke gezichtsvermindering na het aanbrengen van een teststof op het oppervlak aan de voorzijde van het oog, die binnen 21 dagen na het aanbrengen niet volledig omkeerbaar is, zoals gedefinieerd door het mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, GHS) van de Verenigde Naties (VN) (1) en Verordening (EU) nr. 1272/2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels (CLP-verordening)[1]. Eveneens volgens het VN-GHS en de CLP wordt onder *oogirritatie* verstaan veranderingen in het oog na het aanbrengen van een teststof op het oppervlak aan de voorzijde van het oog, die binnen 21 dagen na het aanbrengen volledig omkeerbaar zijn. Teststoffen die ernstig oogletsel veroorzaken worden ingedeeld in VN-GHS/CLP-categorie 1, terwijl teststoffen die oogirritatie veroorzaken, worden ingedeeld in VN-GHS/CLP-categorie 2. Teststoffen die niet zijn geclassificeerd voor oogirritatie of ernstig oogletsel, worden gedefinieerd als chemische stoffen die niet voldoen aan de voorwaarden voor indeling in VN-GHS/CLP-categorie 1 of 2 (2A of 2B), d.w.z. er wordt naar verwezen als VN-GHS/CLP Geen categorie.

2. De bepaling van ernstig oogletsel/oogirritatie ging meestal gepaard met het gebruik van proefdieren (TM B.5 (2)). Bij de keuze van de meest geschikte testmethode en het gebruik van deze testmethode moet de OESO-leidraad voor een geïntegreerde test- en beoordelingsbenadering (Integrated Approach on Testing and Assessment, IATA) voor ernstig oogletsel en oogirritatie worden gevolgd (39).

3. In deze testmethode wordt een in-vitroprocedure beschreven voor het identificeren van chemische stoffen (stoffen en mengsels) waarvoor classificatie en etikettering voor oogirritatie of ernstig oogletsel volgens het VN-GHS en de CLP niet nodig is.

---

[1] Verordening (EG) nr. 1272/2008 van het Europees Parlement en de Raad van 16 december 2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels, tot wijziging en intrekking van de Richtlijnen 67/548/EEG en 1999/45/EG en tot wijziging van Verordening (EG) nr. 1907/2006, PB L 353 van 31.12.2008, blz. 1.

Bij deze procedure wordt gebruikgemaakt van een gereconstrueerd model van menselijk hoornvliesepitheel (reconstructed human cornea-like epithelium, RhCE), dat nauwe overeenkomsten heeft met de histologische, morfologische, biochemische en fysiologische eigenschappen van menselijk hoornvliesepitheel. Er zijn voor ernstig oogletsel/oogirritatie als eindpunt voor de menselijke gezondheid nog vier andere in-vitrotestmethoden gevalideerd, wetenschappelijk geldig bevonden en goedgekeurd als TM B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) en B.68 (6)

4. In deze testmethode zijn twee gevalideerde tests met in de handel verkrijgbare RhCE-modellen opgenomen. Er zijn voor de beoordeling van oogirritatie/ernstig oogletsel valideringsstudies verricht (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) met de EpiOcular™-oogirritatietest (Eye Irritation Test, EIT) en de SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) EIT. Bij elk van deze tests worden in de handel verkrijgbare RhCE-weefselpreparaten als testsysteem gebruikt. Ze worden hierna aangeduid als de Validated Reference Methods – respectievelijk VRM1 en VRM2. Op basis van de valideringsstudies en de onafhankelijke beoordeling daarvan door vakgenoten (9) (12) werd geconcludeerd dat de EpiOcular™ EIT en de SkinEthic™ HCE EIT chemische stoffen (zowel stoffen als mengsels) waarvoor classificatie en etikettering voor oogirritatie of ernstig oogletsel volgens het VN-GHS niet nodig is, correct kunnen identificeren, en werden de tests aanbevolen als wetenschappelijk geldig voor dat doel (13).

5. Op dit moment wordt algemeen aangenomen dat er in de nabije toekomst geen in-vitrotestmethode zal komen die op zichzelf de in-vivo-Draize-oogtest (2) (14) volledig zal kunnen vervangen om voorspellingen te doen voor het volledige responsbereik voor ernstig oogletsel of oogirritatie voor verschillende klassen chemische stoffen. Strategische combinaties van meerdere alternatieve testmethoden binnen (trapsgewijze) teststrategieën zoals de bottom-up-/top-downbenadering kunnen de Draize-oogtest mogelijk echter wel volledig vervangen (15). De bottom-upbenadering (15) is bedoeld om te worden gebruikt wanneer op basis van bestaande informatie verwacht wordt dat een chemische stof onvoldoende oogirritatie zal veroorzaken om classificatie noodzakelijk te maken, terwijl de top-downbenadering (15) bedoeld is om te worden gebruikt wanneer op basis van bestaande informatie verwacht wordt dat een chemische stof ernstig oogletsel veroorzaakt. De EpiOcular™ EIT en de SkinEthic™ HCE EIT worden aanbevolen voor het zonder verdere tests identificeren van chemische stoffen waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is, volgens VN-GHS/CLP Geen categorie, in het kader van een teststrategie zoals de door Scott *et al.* bv. voorgestelde bottom-up-/top-downbenadering, bijvoorbeeld als eerste stap in een bottom-upbenadering of als een van de laatste stappen in een top-downbenadering (15). De EpiOcular™ EIT en de SkinEthic™ HCE EIT zijn echter niet bedoeld om onderscheid te maken tussen VN-

GHS/CLP-categorie 1 (ernstig oogletsel) en VN-GHS/CLP-categorie 2 (oogirritatie). Dit onderscheid zal door een andere trap van een teststrategie moeten worden gemaakt (15). Wanneer een teststof die met de EpiOcular™ EIT of de SkinEthic™ HCE EIT wordt geïdentificeerd als stof die moet worden geclassificeerd voor oogirritatie/ernstig oogletsel, moeten er dus nog aanvullende tests (in vitro en/of in vivo) worden uitgevoerd om tot een definitieve conclusie te komen VN-GHS/CLP Geen categorie, -categorie 2 of -categorie 1), met behulp van bv. TM B.47, B.48, B.61 of B.68.

6. Deze testmethode is bedoeld om de procedure te beschrijven die wordt gebruikt om het mogelijke gevaar van een teststof voor de ogen te beoordelen op basis van het vermogen van deze chemische stof om cytotoxiciteit te veroorzaken in een RhCE-weefselpreparaat, zoals gemeten met de MTT-test (16) (zie punt 21). De levensvatbaarheid van het RhCE-weefsel na blootstelling aan een teststof wordt bepaald in vergelijking met weefsels die met de negatievecontrolestof zijn behandeld (% levensvatbaarheid), en wordt vervolgens gebruikt om het mogelijke gevaar van de teststof voor de ogen te voorspellen.

7. Er zijn prestatienormen beschikbaar (17) om de validering van nieuwe of gewijzigde, op RhCE gebaseerde in-vitrotests die vergelijkbaar zijn met de EpiOcular™ EIT en de SkinEthic™ HCE EIT, te vergemakkelijken volgens de beginselen van OESO-leidraad nr. 34 (18) en tijdige wijziging van OESO-TG 492 met het oog op de opname van dergelijke testmethoden mogelijk te maken. De wederzijdse aanvaarding van gegevens in overeenstemming met de OESO-overeenkomst is enkel gewaarborgd voor tests die zijn gevalideerd volgens de prestatienormen, voor zover die tests door de OESO zijn geëvalueerd en zijn opgenomen in de overeenkomstige testrichtlijn.

DEFINITIES

8. Definities worden gegeven in aanhangsel 1.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

9. Deze testmethode is gebaseerd op in de handel verkrijgbare, driedimensionale RhCE-weefselpreparaten die worden vervaardigd op basis van hetzij primaire menselijke epidermiskeratinocyten (d.w.z. EpiOcular™ OCL-200) of geïmmortaliseerde menselijke hoornvliesepitheelcellen (d.w.z. SkinEthic™ HCE/S). De EpiOcular™ OCL-200) en de SkinEthic™ HCE/S RhCE-weefselpreparaten zijn vergelijkbaar met de driedimensionale in-vivostructuur van hoornvliesepitheel en worden vervaardigd op basis van cellen van de doelsoort (19) (20). Bovendien meten de tests rechtstreeks de cytotoxiciteit als gevolg van de penetratie van de chemische stof door het hoornvlies en de veroorzaking van cel- en weefselschade; deze cytotoxische reactie is

bepalend voor de algemene uitkomst voor ernstige oogletsel/oogirritatie in vivo. Er zijn verscheidene werkingsmechanismen waardoor celbeschadiging kan optreden (zie punt 20), maar cytotoxiciteit speelt een belangrijke, zo niet de voornaamste, mechanistische rol die bepalend is voor de algemene respons van een chemische stof als het gaat om ernstig oogletsel/oogirritatie. Deze manifesteert zich in vivo voornamelijk als vertroebeling van het hoornvlies, iritis, conjunctivale roodheid en/of conjunctivale chemosis, ongeacht de fysisch-chemische processen die de weefselschade veroorzaken.

10. In de valideringsstudie die aan deze testmethode ten grondslag ligt, is een breed spectrum aan chemische stoffen getest, die vele verschillende stoftypen, chemische klassen, molecuulgewichten, LogP's, chemische structuren enz. vertegenwoordigen. De valideringsdatabank van de EpiOcular™ EIT bevatte in totaal 113 chemische stoffen, die volgens een analyse met de QSAR-toolbox van de OESO 95 verschillende organische functionele groepen bestreken (8). De meeste van deze chemische stoffen waren stoffen die stoffen die uit één component bestaan, maar er werden ook stoffen die uit meerdere componenten bestaan, (waaronder 3 homopolymeren, 5 copolymeren en 10 quasipolymeren) in de studie opgenomen. Wat fysische toestand en VN-GHS/CLP-categorieën betreft, waren de 113 geteste chemische stoffen als volgt verdeeld: 13 categorie 1-vloeistoffen, 15 categorie 1-vaste stoffen, 6 categorie 2A-vloeistoffen, 10 categorie 2A-vaste stoffen, 7 categorie 2B-vloeistoffen, 7 categorie 2B-vaste stoffen, 27 Geen categorie-vloeistoffen en 28 Geen categorie-vaste stoffen (8). De valideringsdatabank van de SkinEthic™ HCE EIT bevatte in totaal 200 chemische stoffen, die 165 verschillende organische functionele groepen bestreken (8) (10) (11). De meeste van deze chemische stoffen waren stoffen die stoffen die uit één component bestaan, maar er werden ook stoffen die uit meerdere componenten bestaan, (waaronder 10 polymeren) in de studie opgenomen. Wat fysische toestand en VN-GHS/CLP-categorieën betreft, waren de 200 geteste chemische stoffen als volgt verdeeld: 27 categorie 1-vloeistoffen, 24 categorie 1-vaste stoffen, 19 categorie 2A-vloeistoffen, 10 categorie 2A-vaste stoffen, 9 categorie 2B-vloeistoffen, 8 categorie 2B-vaste stoffen, 50 Geen categorie-vloeistoffen en 53 Geen categorie-vaste stoffen (10) (11).

11. Deze testmethode is van toepassing op stoffen en mengsels, en op vaste stoffen, vloeibare stoffen, halfvaste stoffen en wassen. Vloeistoffen mogen waterig of niet-waterig zijn; vaste stoffen mogen al dan niet in water oplosbaar zijn. Waar mogelijk moeten vaste stoffen tot een fijn poeder worden vermalen voordat ze worden aangebracht; verdere voorbehandeling van het monster is niet nodig. Gassen en aerosolen zijn niet gevalideerd in een valideringsstudie. Hoewel het denkbaar is dat deze met behulp van RhCE-technologie kunnen worden getest, staat de huidige testmethode het testen van gassen en aerosolen niet toe.

12. Teststoffen die (van nature of na behandeling) licht absorberen in hetzelfde bereik als MTT-formazan, en teststoffen die de vitale kleurstof MTT rechtstreeks kunnen reduceren (tot MTT-formazan), kunnen de metingen van de levensvatbaarheid van het weefsel verstoren, zodat het bij deze stoffen nodig is om aangepaste controles te gebruiken met het oog op correcties. Wat voor aangepaste controles er eventueel nodig zijn hangt af van het soort verstoring door de teststof en de procedure die wordt gebruikt voor het kwantificeren van MTT-formazan (zie punten 36-42).

13. De resultaten van de prevalideringsstudies (21) (22) en de volledige valideringsstudies (8) (10) (11) hebben uitgewezen dat EpiOcular™ EIT en SkinEthic™ HCE EIT beide overdraagbaar zijn naar laboratoria die kunnen worden beschouwd als zonder enige ervaring met het uitvoeren van de bepalingen, en ook reproduceerbaar zijn binnen één laboratorium en tussen laboratoria. Uit deze studies komt naar voren dat voor EpiOcular™ EIT de mate van reproduceerbaarheid wat betreft de concordantie van voorspellingen die kan worden verwacht op basis van de gegevens over 113 chemische stoffen, in de orde van grootte van 95 % ligt binnen laboratoria en 93 % tussen laboratoria. Voor SkinEthic™ HCE EIT ligt de mate van reproduceerbaarheid wat betreft de concordantie van voorspellingen die kan worden verwacht op basis van de gegevens over 120 chemische stoffen, in de orde van grootte van 92 % binnen laboratoria en 95 % tussen laboratoria.

14. De EpiOcular™ EIT kan ook worden gebruikt om chemische stoffen te identificeren die niet hoeven te worden ingedeeld voor oogirritatie of ernstig oogletsel volgens het VN-GHS/CLP-classificatiesysteem. In het licht van de gegevens die zijn verkregen in de valideringsstudie (8), heeft de EpiOcular™ EIT een algemene nauwkeurigheid van 80 % (op basis van 112 chemische stoffen), een gevoeligheid van 96 % (op basis van 57 chemische stoffen), een percentage vals-negatieve uitslagen van 4 % (op basis van 57 chemische stoffen), een specificiteit van 63 % (op basis van 55 chemische stoffen) en een percentage vals-positieve uitslagen van 37 % (op basis van 55 chemische stoffen), in vergelijking met de referentiegegevens verkregen met de in-vivo-oogtest bij konijnen (TM B.5) (2) (14) en ingedeeld volgens het VN-GHS/CLP-classificatiesysteem. In een studie waarin 97 vloeibare agrochemische formuleringen werden getest met de EpiOcular™ EIT, bleek het prestatieniveau van de testmethode voor dit type mengsels vergelijkbaar ten opzichte van de valideringsstudie (23). De 97 formuleringen waren als volgt verdeeld: 21 categorie 1, 19 categorie 2A, 14 categorie 2B en 43 Geen categorie, ingedeeld volgens het VN-GHS/CLP-classificatiesysteem op basis van referentiegegevens verkregen met de in-vivo-oogtest bij konijnen (TM B.5) (2) (14). De algemene nauwkeurigheid was 82 % (op basis van 97 formuleringen), de gevoeligheid 91 % (op basis van 54 formuleringen), het percentage vals-negatieve uitslagen 9 % (op basis van 54 formuleringen), de

specificiteit 72 % (op basis van 43 formuleringen) en het percentage vals-positieve uitslagen 28 % (op basis van 43 formuleringen) (23).

15. De SkinEthic™ HCE EIT kan ook worden gebruikt om chemische stoffen te identificeren die niet hoeven te worden ingedeeld voor oogirritatie of ernstig oogletsel volgens het VN-GHS/CLP-classificatiesysteem. In het licht van de gegevens die zijn verkregen in de valideringsstudie (10) (11), heeft de SkinEthic™ HCE EIT een algemene nauwkeurigheid van 84 % (op basis van 200 chemische stoffen), een gevoeligheid van 95 % (op basis van 97 chemische stoffen), een percentage vals-negatieve uitslagen van 5 % (op basis van 97 chemische stoffen), een specificiteit van 72 % (op basis van 103 chemische stoffen) en een percentage vals-positieve uitslagen van 28 % (op basis van 103 chemische stoffen), in vergelijking met de referentiegegevens verkregen met de in-vivo-oogtest bij konijnen (TM B.5) (2) (14) en ingedeeld volgens het VN-GHS/CLP-classificatiesysteem.

16. De percentages vals-negatieve uitslagen die met beide RhCE-tests werden verkregen voor stoffen of mengsels, vallen binnen de algemene waarschijnlijkheid van 12 % dat stoffen in herhaalde tests met de in-vivo-Draize-oogtest als VN-GHS/CLP-categorie 2 of als VN-GHS/CLP Geen categorie worden geïdentificeerd; dit is het gevolg van de inherente intertestvariabiliteit van de methode (24). De percentages vals-positieve uitslagen die met beide RhCE-tests werden verkregen voor stoffen of mengsels, zijn niet kritiek in deze context van deze testmethode, omdat voor alle teststoffen die een weefsellevensvatbaarheid opleveren die gelijk is aan of lager dan de vastgestelde grenswaarden (zie punt 44), aanvullende tests zullen moeten worden uitgevoerd met andere in-vitrotestmethoden of als laatste optie met konijnen, afhankelijk van de wettelijke voorschriften, volgens een sequentiële teststrategie en op bewijskracht gebaseerde aanpakken. Deze testmethoden kunnen worden gebruikt voor alle soorten chemische stoffen, waarbij een negatief resultaat moet worden aangenomen om een chemische stof niet in te delen voor oogirritatie en ernstig oogletsel (VN-GHS/CLP Geen categorie). Voordat de EpiOcular™ EIT en de SkinEthic™ HCE EIT worden gebruikt in een bottom-upbenadering volgens andere classificatiesystemen dan het VN-GHS/CLP-systeem, moeten de toepasselijke regelgevingsinstanties worden geraadpleegd.

17. Aan deze testmethode kleeft de beperking dat ze geen onderscheid kan maken tussen oogirritatie/omkeerbare effecten op ogen (categorie 2) en ernstig oogletsel/onomkeerbare effecten op ogen (categorie 1) zoals gedefinieerd door het VN-GHS en de CLP, noch tussen stoffen die irriterend zijn voor het oog (optionele categorie 2A), en stoffen die mild irriterend zijn voor het oog (optionele categorie 2B), zoals gedefinieerd door het VN-GHS (1). Hiervoor zijn verdere tests met andere in-vitrotestmethoden nodig.

18. De term "teststof" wordt in deze teststof gebruikt om te verwijzen naar datgene dat wordt getest[1], en houdt geen verband met de toepasselijkheid van de RhCE-testmethode op het testen van stoffen en/of mengsels.

PRINCIPE VAN DE TEST

19. De teststof wordt plaatselijk aangebracht op ten minste twee driedimensionale RhE-weefselpreparaten en na de blootstelling en een incubatieperiode na de behandeling wordt de weefsellevensvatbaarheid gemeten. De RhCE-weefsels worden gereconstrueerd uit primaire menselijke epidermiskeratinocyten of geïmmortaliseerde menselijke hoornvliesepitheelcellen, die meerdere dagen zijn gekweekt tot gelaagd, hooggedifferentieerd plaveiselcelepitheel dat morfologisch vergelijkbaar is met het epitheel in het menselijk hoornvlies. Het EpiOcular™ RhCE-weefselpreparaat bestaat uit ten minste 3 levensvatbare cellagen en een niet-gekeratiniseerd oppervlak, met een hoornvliesachtige structuur analoog aan die in vivo wordt aangetroffen. Het SkinEthic™ HCE RhCE-weefselpreparaat bestaat uit ten minste 4 levensvatbare cellagen, bestaande uit cilindrische basaalcellen, tussenliggende wingcellen en plaveiselcellen aan de oppervlakte, vergelijkbaar met de opbouw van normaal menselijk hoornvliesepitheel (20) (26).

20. Door chemische stoffen geïnduceerd(e) ernstig oogletsel/oogirritatie dat/die zich voornamelijk in vivo manifesteert als vertroebeling van het hoornvlies, irititis, conjunctivale roodheid en/of conjunctivale chemosis, is het gevolg van een cascade van gebeurtenissen, beginnend met de penetratie van de chemische stoffen door het hoornvlies en/of de conjunctiva en de veroorzaking van schade aan de cellen. Er zijn verscheidene werkingsmechanismen waardoor celbeschadiging kan optreden, waaronder: lysis van de celmembraan (bv. door oppervlakteactieve stoffen, organische oplosmiddelen); coagulatie van macromoleculen (vooral eiwitten) (bv. door oppervlakteactieve stoffen, organische oplosmiddelen, alkaliën en zuren); verzeping van lipiden (bv. door alkaliën); en alkylering of andere covalente interacties met macromoleculen (bv. door bleekmiddelen, peroxiden en alkylatoren (15) (27) (28). Er is evenwel aangetoond dat cytotoxiciteit een belangrijke, zo niet de voornaamste, mechanistische rol speelt, die bepalend is voor de algemene respons van een chemische stof als het gaat om ernstig oogletsel/oogirritatie, ongeacht de fysisch-chemische processen die de weefselschade veroorzaken (29) (30). Bovendien wordt

[1] In juni 2013 heeft de gezamenlijke vergadering van de OESO besloten dat er in nieuwe en bijgewerkte OESO-testrichtlijnen waar mogelijk consequenter gebruikgemaakt moet worden van de term "teststof" om te beschrijven wat er getest wordt.

het potentieel van een chemische stof voor ernstig oogletsel/oogirritatie hoofdzakelijk bepaald door de omvang van het aanvankelijke letsel (31), dat gecorreleerd is met de mate van celdood (29) en met de omvang van de erop volgende reacties en de uiteindelijke gevolgen (32). Licht irriterende stoffen hebben dus alleen een uitwerking op het oppervlak van het hoornvliesepitheel, mild en matig irriterende stoffen veroorzaken voornamelijk schade aan het epitheel en het oppervlakkige stroma, en hevig irriterende stoffen brengen schade toe aan het epitheel, het diepe stroma en soms het hoornvliesendotheel (30) (33). De levensvatbaarheid van het RhCE-weefselpreparaat na plaatselijke blootstelling aan een teststof voor het identificeren van chemische stoffen waarvoor classificatie voor ernstig oogletsel/oogirritatie niet nodig is (VN-GHS/CLP Geen categorie), wordt gemeten op basis van de aanname dat alle chemische stoffen die ernstig oogletsel of oogirritatie veroorzaken cytotoxiciteit zullen veroorzaken in het hoornvliesepitheel en/of de conjunctiva.

21. De RhCE-weefsellevensvatbaarheid wordt gemeten aan de hand van de klassieke methode van enzymatische omzetting van de vitale kleurstof MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromide; thiazolylblauw tetrazoliumbromide; CAS-nummer 298-93-1] door de levensvatbare cellen van het weefsel in een blauw MTT-formazanzout dat kwantitatief wordt gemeten na extractie uit weefsels (16). Chemische stoffen waarvoor classificatie en etikettering volgens VN-GHS/CLP niet nodig is (Geen categorie), worden geïdentificeerd als stoffen die de weefsellevensvatbaarheid niet tot onder een bepaalde drempelwaarde verlagen (d.w.z. weefsellevensvatbaarheid > 60 % in EpiOcular™ EIT en SkinEthic™ HCE EITL[1], of > 50 % in SkinEthic™ HCE EITS[2]) (zie punt 44).

AANTONING VAN BEKWAAMHEID

22. Voordat de RhCE-tests routinematig worden gebruikt met het oog op regelgeving, moeten laboratoria hun technische bekwaamheid aantonen door een correcte voorspelling te doen voor de vijftien in tabel 1 aanbevolen chemische stoffen voor bekwaamheidstoetsing. Het betreft een selectie uit de chemische stoffen die werden gebruikt in de valideringsstudies van de VRM's (8) (10) (11). Voor zover mogelijk omvat de selectie chemische stoffen die: i) verschillende fysische toestanden bestrijken; ii) het volledige responsbereik voor ernstig oogletsel of oogirritatie

[1] EITL: EIT voor vloeistoffen in het geval van SkinEthic™ HCE.

[2] EITS: EIT voor vaste stoffen in het geval van SkinEthic™ HCE.

bestrijken op basis van resultaten van zeer goede kwaliteit die zijn verkregen in de referentie-in-vivo-oogtest bij konijnen (TM B.5) (2) (14), het VN-GHS-classificatiesysteem (d.w.z. categorieën 1, 2A, 2B en Geen categorie) (1) en het CLP-classificatiesysteem (d.w.z. categorieën 1, 2 en Geen categorie); iii) de uiteenlopende in-vivoclassificatiecriteria bestrijken (24) (25); iv) representatief zijn voor de chemische klassen die in de valideringsstudie zijn gebruikt (8) (10) (11); v) een breed en representatief spectrum van organische functionele groepen bestrijken (8) (10) (11); vi) een goed omschreven chemische structuur hebben (8) (10) (11); vii) gekleurd zijn en/of rechtstreeks MTT reduceren; viii) tijdens de validering van de RhCE-testmethoden reproduceerbare resultaten opleverden; ix) tijdens de validering van de RhCE-testmethoden correct werden ingedeeld door deze tests; x) het volledige in-vitroresponsbereik bestrijken op basis van referentiegegevens voor de RhCE-testmethoden van zeer goede kwaliteit (0 tot 100 % levensvatbaarheid); xi) in de handel verkrijgbaar zijn; en waaraan xii) geen buitensporige aanschaf- en/of verwijderingskosten verbonden zijn. In situaties waarin een chemische stof in de lijst niet beschikbaar is of om andere gerechtvaardigde redenen niet kan worden gebruikt, mag een andere chemische stof worden gebruikt, mits deze aan de bovenstaande criteria voldoet, bv. een van de andere chemische stoffen die bij de validering van de VRM zijn gebruikt. Dergelijke afwijkingen moeten echter wel worden verantwoord.

Tabel 1: Lijst van chemische stoffen voor bekwaamheidstoetsing

Chemische benaming	CAS RN	Organische functionele groepen[1]	Fysische toestand	VRM1-levensvatbaarheid (%)[2]	VRM2-levensvatbaarheid (%)[3]	VRM-voorspelling	MTT reducerende stof	Kleurinterf.
Categorie 1 in vivo[4]								
Methylthioglycolaat	2365-48-2	Carbonzuurester; Thioalcohol	Vloeistof	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	Er kan geen voorspelling worden gedaan	J (sterk)	N
Hydroxyethylacrylaat	818-61-1	Acrylaat; Alcohol	Vloeistof	7,5 ± 4,7[5]	1,6 ± 1,0	Er kan geen voorspelling worden gedaan	N	N
2,5-Dimethyl-2,5-hexaandiol	110-03-2	Alcohol	Vaste stof	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	Er kan geen voorspelling worden gedaan	N	N
Natriumoxalaat	62-76-0	Oxocarbonzuur	Vaste stof	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	Er kan geen voorspelling worden gedaan	N	N
Categorie 2A in vivo4								
2,4,11,13-Tetraäzatetradecaan-diimidamide, *N*,*N*''-bis(4-chloorfenyl)-3,12-diimino-, di-D-gluconaat (20 %, waterig)[6]	18472-51-0	Aromatische heterocyclische halide; Arylhalogenide; Dihydroxylgroep; Guanidine	Vloeistof	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	Er kan geen voorspelling worden gedaan	N	J (zwak)
Natriumbenzoaat	532-32-1	Aryl; Carbonzuur	Vaste stof	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	Er kan geen voorspelling worden gedaan	N	N
Categorie 2B in vivo[4]								

Chemische benaming	CAS RN	Organische functionele groepen[1]	Fysische toestand	VRM1-levensvatbaarheid (%)[2]	VRM2-levensvatbaarheid (%)[3]	VRM-voorspelling	MTT reducerende stof	Kleurinterf.
Diëthyltoluamide	134-62-3	Benzamide	Vloeistof	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	Er kan geen voorspelling worden gedaan	N	N
2,2-Dimethyl-3-methyleenbicyclo[2.2.1]heptaan	79-92-5	Alkaan, vertakt met tertiaire koolstof; Alkeen; Bicycloheptaan; Gebrugde koolstofringen; Cycloalkaan	Vaste stof	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	Er kan geen voorspelling worden gedaan	N	N
Geen categorie in vivo[4]								
1-Ethyl-3-methylimidazoliumethylsulfaat	342573-75-5	Alkoxy; Ammoniumzout; Aryl; Imidazool; Sulfaat	Vloeistof	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Geen categorie	N	N
Dicaprylylether	629-82-3	Alkoxy; Ether	Vloeistof	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Geen categorie	N	N
Piperonylbutoxide	51-03-6	Alkoxy; Benzodioxool; Benzyl; Ether	Vloeistof	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Geen categorie	N	N
Polyethyleenglycol (PEG-40) gehydrogeneerde ricinusolie	61788-85-0	Acylal; Alcohol; Allyl; Ether	Viskeus	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Geen categorie	N	N
1-(4-Chloorfenyl)-3-(3,4-dichloorfenyl)ureum	101-20-2	Aromatische heterocyclische halide; Arylhalogenide; Ureumderivaat	Vaste stof	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	Geen categorie	N	N

Chemische benaming	CAS RN	Organische functionele groepen[1]	Fysische toestand	VRM1-levensvatbaarheid (%)[2]	VRM2-levensvatbaarheid (%)[3]	VRM-voorspelling	MTT reducerende stof	Kleurinterf.
2,2'-Methyleenbis(6-(2*H*-benzotriazool-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)fenol)	103597-45-1	Alkaan, vertakt met quaternaire koolstof; Gefuseerde carbocyclische aromaat; Gefuseerde verzadigde heterocyclische verbinding; Chinoïdeprecursor; *tert*-Butylester	Vaste stof	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	Geen categorie	N	N
Kaliumtetrafluorboraat	14075-53-7	Anorganisch zout	Vaste stof	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Geen categorie	N	N

Afkortingen: CAS RN = registratienummer van de Chemical Abstract Service; VN-GHS = mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen (1); VRM1 = gevalideerde referentiemethode 1, EpiOcular™ EIT; VRM2 = gevalideerde referentiemethode 2, SkinEthic™ HCE EIT; Kleurinterf. = kleurinterferentie met de standaard extinctiemeting (optische dichtheid (OD)) van MTT-formazan.

[1]Organische functionele groep toegekend volgens een geneste analyse met OESO-toolbox 3.1 (8).

[2]Op basis van resultaten verkregen met de EpiOcular™ EIT in de oogirritatievalideringsstudie (Eye Irritation Validation Study, EIVS) van het EURL CEVMA/Cosmetics Europe (8).

[3]Op basis van resultaten verkregen met de SkinEthic™ HCE EIT in de valideringsstudie (10) (11).

[4]Gebaseerd op de resultaten van de in-vivo-oogtest op konijnen (TM B.5/OESO TG 405) (2) (14) en aan de hand van het VN-GHS.

[5]Op basis van resultaten verkregen in het teststrategie-onderzoek van het CEFIC CONsortium for *in vitro* Eye Irritation testing strategy (CON4EI).

[6]Indeling in categorie 2A of 2B hangt af van de interpretatie van het VN-GHS-criterium voor het onderscheiden van deze twee categorieën, d.w.z. 1 van de 3 versus 2 van de 3 dieren met effecten op dag 7 nodig voor indeling in categorie 2A. Het in-vivo-onderzoek omvatte 3 dieren. Alle eindpunten behalve vertroebeling van het hoornvlies in één dier herstelden tot een score van nul op dag 7 of eerder. Het ene dier dat op dag 7 niet volledig was hersteld, had een score van 1 (op dag 7) voor de vertroebeling van het hoornvlies, die volledig was hersteld op dag 9.

23. Als onderdeel van deze bekwaamheidstoetsing wordt aanbevolen dat de gebruikers na ontvangst de door de fabrikant van het RhCE-weefselpreparaat gespecificeerde barrière-eigenschappen van de weefsels verifiëren (zie de punten 25, 27 en 30). Dit is in het bijzonder van belang indien weefsels over lange afstanden/gedurende lange perioden zijn vervoerd. Zodra een test met succes is opgezet en de bekwaamheid in het gebruik ervan is verworven en aangetoond, behoeft een dergelijke verificatie niet routinematig te worden uitgevoerd. Echter, indien een test routinematig wordt gebruikt, wordt aanbevolen om de barrière-eigenschappen op regelmatige basis te blijven toetsen.

PROCEDURE

24. De tests die op dit moment onder deze testmethode vallen, zijn de wetenschappelijk geldige EpiOcular™ EIT en SkinEthic™ HCE EIT (9) (12) (13), aangeduid als de Validated Reference Methods (respectievelijk VRM1 en VRM2). De standaardwerkwijzen voor de RhCE-tests zijn beschikbaar en dienen te worden gevolgd wanneer de tests in een laboratorium wordt toegepast en gebruikt (34) (35). In de volgende punten en aanhangsel 2 worden de belangrijkste onderdelen en procedures van de RhCE-tests beschreven.

COMPONENTEN VAN DE RHCE-TESTMETHODE

Algemene voorwaarden

25. Voor het reconstrueren van het driedimensionale model van hoornvliesepitheelcellen moeten relevante, uit mensen verkregen cellen worden gebruikt. Het model moet worden opgebouwd uit lagen van naar het oppervlak geleidelijk plattere cellen, maar zonder verhoornde cellen. Het RhCE-weefselpreparaat wordt bereid op inzetstukken met een poreus synthetisch membraan dat voedingsstoffen doorlaat naar de cellen. Er moeten in het gereconstrueerde hoornvliesepitheelmodel meerdere lagen van levensvatbare, niet gekeratiniseerde epitheelcellen aanwezig zijn. Het oppervlak van het RhCE-weefselpreparaat moet in rechtstreeks contact staan met de lucht, zodat het rechtstreeks kan worden blootgesteld aan de teststoffen op een manier die vergelijkbaar is met blootstelling van hoornvliesepitheel in vivo. Het RhCE-weefselpreparaat moet een functionele barrière vormen die voldoende robuust is om bestand te zijn tegen snelle penetratie van cytotoxische ijkstoffen, bv. Triton X-100 of natriumdodecylsulfaat (SDS). De barrièrefunctie moet worden aangetoond en kan worden beoordeeld door de blootstellingstijd te bepalen die nodig is om de weefsellevensvatbaarheid met 50 % te doen dalen (ET_{50}) bij aanbrenging van de ijkstof in een bepaalde, vaste concentratie (bv. 100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100), of door de concentratie te bepalen waarin een ijkstof de weefsellevensvatbaarheid met

50 % doet dalen (IC_{50}) na een vaste blootstellingstijd (bv. 30 minuten behandeling met 50 µl SDS) (zie punt 30). De omsluitingseigenschappen van het RhCE-weefselpreparaat moeten voorkomen dat teststof om de rand van het levensvatbare weefsel heen het levende weefsel kan bereiken. Dat zou een slecht model voor hoornvliesblootstelling kunnen opleveren. De bij mensen verkregen cellen die worden gebruikt om het RhCE-weefselpreparaat op te bouwen, mogen niet verontreinigd zijn met bacteriën, virussen, mycoplasma of schimmels. De leverancier moet controleren of het weefselpreparaat steriel is en niet verontreinigd is met schimmels of bacteriën.

Functionele voorwaarden

Levensvatbaarheid

26. De levensvatbaarheid van het weefsel wordt gekwantificeerd door middel van de MTT-test (16). De levensvatbare cellen van het RhCE-weefselpreparaat reduceren de vitale kleurstof MTT tot een blauw MTT-formazanprecipitaat, dat vervolgens met isopropanol (of een vergelijkbaar oplosmiddel) uit het weefsel wordt geëxtraheerd. Het geëxtraheerde MTT-formazan kan worden gekwantificeerd met behulp van hetzij een standaard extinctiemeting (meting van de optische dichtheid (OD)) of een HPLC/UPLC-spectrofotometrieprocedure (36). De OD van het extractieoplosmiddel alleen moet voldoende klein zijn, d.w.z. OD < 0,1. Gebruikers van het RhCE-weefselpreparaat moeten waarborgen dat iedere gebruikte batch van het RhCE-weefselpreparaat voldoet aan gedefinieerde criteria voor de negatieve controle. In tabel 2 worden de aanvaardbaarheidsbereiken voor de OD-waarden in negatieve controle voor de VRM's gegeven. Bij gebruik van HPLC/UPLC-spectrofotometrie moeten de OD-bereiken in negatieve controle in tabel 2 als aanvaardbaarheidscriterium voor de negatieve controles worden gebruikt. In het testverslag moet worden gedocumenteerd dat de weefsels die zijn behandeld met de negatievecontrolestof, gedurende de volledige blootstellingsperiode van de test in cultuur stabiel zijn (een vergelijkbare gemeten weefsellevensvatbaarheid opleveren). De weefselproducent moet als onderdeel van de QC-weefselbatchvrijgave een vergelijkbare procedure uitvoeren, maar daarbij gelden mogelijk andere aanvaardbaarheidscriteria dan de criteria in tabel 2. De ontwikkelaar/leverancier van een RhCE-weefselpreparaat moet een aanvaardbaarheidsbereik (boven- en ondergrens) vaststellen voor de OD-waarden in negatieve controle (onder de omstandigheden van de QC-testmethode).

Tabel 2: Aanvaardbaarheidsbereiken voor OD-waarden in negatieve controle (voor gebruikers van de test)

Test	Ondergrens aanvaardbaarheid	Bovengrens aanvaardbaarheid
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (voor protocollen voor vloeistoffen en voor	> 0,8[1]	< 2,5

vaste stoffen)		
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (voor protocollen voor vloeistoffen en voor vaste stoffen)	> 1,0	≤ 2,5

[1]Voor deze aanvaardbaarheidsgrens is rekening gehouden met de mogelijkheid van een langere vervoers-/bewaringsduur (bv. > 4 dagen), waarvan is aangetoond dat deze geen invloed heeft op de prestaties van de testmethode (37).

Barrièrefunctie

27. Het RhCE-weefselpreparaat moet dik en robuust genoeg zijn om bestand te zijn tegen snelle penetratie van cytotoxische ijkstoffen, zoals beoordeeld aan de hand van bv. de ET_{50} (Triton X-100) of de IC_{50} (SDS). (tabel 3). Voor elke batch van het gebruikte RhCE-weefselpreparaat moet de ontwikkelaar/leverancier van het RhCE-weefselpreparaat bij levering van de weefsels aan de eindgebruiker de barrièrefunctie aantonen (zie punt 30).

Morfologie

28. Uit histologisch onderzoek van het RhCE-weefselpreparaat moet blijken dat het een vergelijkbare structuur heeft als menselijk hoornvliesepitheel (met ten minste 3 lagen van levensvatbare epitheelcellen en een niet-gekeratiniseerd oppervlak). Voor de VRM's is de door de ontwikkelaar/leverancier vastgesteld dat de weefselpreparaten een geschikte morfologie hebben, en hoeft de gebruiker van de testmethode dit dus niet zelf nogmaals voor elke gebruikte weefselbatch aan te tonen.

Reproduceerbaarheid

29. De resultaten van de positieve en negatieve controles van de testmethode moeten reproduceerbaar zijn in de tijd.

Kwaliteitscontrole (QC)

30. Het RhCE-weefselpreparaat mag alleen worden gebruikt als de ontwikkelaar/leverancier aantoont dat iedere batch van het gebruikte RhCE-weefselpreparaat voldoet aan gedefinieerde productievrijgavecriteria, waarvan die voor levensvatbaarheid (punt 26) en barrièrefunctie (zie punt 27) de meest relevante zijn. De ontwikkelaar/leverancier van een RhCE-weefselpreparaat moet een aanvaardbaarheidsbereik (boven- en ondergrens) vaststellen voor de barrièrefuncties zoals gemeten aan de hand van de ET_{50} of de IC_{50} (zie de punten 25 en 26). Het aanvaardbaarheidsbereik voor de ET_{50} en de IC_{50} dat door de ontwikkelaar/leverancier van de (in de VRM's gebruikte) RhCE-weefselpreparaten als QC-criterium voor batchvrijgave wordt gebruikt, staat in tabel 3. De ontwikkelaar/leverancier van een RhCE-weefselpreparaat moet de gebruikers van de testmethode gegevens verstrekken waaruit blijkt dat aan alle productievrijgavecriteria wordt voldaan, zodat de gebruikers deze informatie in het testverslag kunnen opnemen. Alleen resultaten die

zijn verkregen met weefsels die aan alle productievrijgavecriteria voldoen, zijn aanvaardbaar voor een betrouwbare voorspelling voor chemische stoffen waarvoor classificatie en etikettering voor oogirritatie of ernstig oogletsel volgens VN-GHS/CLP niet nodig is.

Tabel 3: QC-criterium voor batchvrijgave

Test	Ondergrens aanvaardbaarheid	Bovengrens aanvaardbaarheid
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100)	IC_{50} = 12,2 min	IC_{50} = 37,5 min
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (30 minuten behandeling met 50 µl SDS)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Het aanbrengen van de teststof en de controlestoffen

31. Er moeten ten minste twee duploweefsels worden gebruikt voor iedere teststof en iedere controlestof in ieder experiment. Er worden twee verschillende behandelingsprotocollen gebruikt, een voor vloeibare teststoffen en een voor vaste teststoffen (34) (35). Voor beide methoden en protocollen moet het oppervlak van het weefselpreparaat worden bevochtigd met calcium- en magnesiumvrije fosfaatgebufferde zoutoplossing van Dubecco (Ca^{2+}/Mg^{2+}-vrije DPBS) alvorens teststoffen worden aangebracht, om de natte omstandigheden van het menselijk oog na te bootsen. De behandeling van de weefsels wordt begonnen door ze aan de teststof(fen) en controlestoffen bloot te stellen. Voor beide behandelingsprotocollen in beide VRM's moet er zo veel teststof of controlestof worden aangebracht dat het epitheeloppervlak gelijkmatig bedekt is. Er mag echter geen oneindige dosis worden gebruikt (zie de punten 32 en 33) (aanhangsel 2).

32. Teststoffen die kunnen worden gepipetteerd bij temperaturen van 37 °C of lager (zo nodig met een plunjerpipet), worden in de VRM's als vloeistoffen behandeld. Zo niet, dan worden ze als vaste stoffen behandeld (zie punt 33). In de VRM's wordt een vloeibare teststof gelijkmatig over het weefseloppervlak verspreid (d.w.z. er wordt ten minste 60 µl/cm^2 aangebracht) (zie aanhangsel 2, (33) (34)). Om de juiste dosering op het weefsel te garanderen, moeten capillaire effecten (oppervlaktespanningseffecten) die kunnen optreden als gevolg van de geringe volumes die op het inzetstuk (op het weefseloppervlak) worden aangebracht, zo veel mogelijk worden vermeden. Met vloeibare teststoffen behandelde weefsels worden 30 min geïncubeerd onder standaard kweekomstandigheden (37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH). Aan het einde van de blootstellingsperiode moeten de vloeibare teststof en de controlestoffen zorgvuldig van het weefseloppervlak worden verwijderd door grondig te spoelen met Ca2+/Mg2+-vrije DPBS bij kamertemperatuur. Deze spoelstap wordt gevolgd door onderdompeling in vers medium bij kamertemperatuur (om alle in het weefsel geabsorbeerde teststof te verwijderen) gedurende een vooraf bepaalde tijd die varieert

afhankelijk van de gebruikte VRM. Alleen bij VRM1 wordt een na-incubatie in vers medium onder standaard kweekomstandigheden toegepast, voordat de MTT-test wordt uitgevoerd (zie aanhangsel 2 (34) (35)).

33. Teststoffen die niet kunnen worden gepipetteerd bij temperaturen van 37 °C of lager, worden in de VRM's als vaste stoffen behandeld. De hoeveelheid teststof die wordt aangebracht, moet voldoende zijn om het gehele weefseloppervlak te bedekken, d.w.z. er wordt ten minste 60 mg/cm^2 aangebracht (aanhangsel 2). Indien mogelijk moeten vaste stoffen in de vorm van een fijn poeder worden getest. Met vaste teststoffen behandelde weefsels worden gedurende een vooraf bepaalde tijd (afhankelijk van de gebruikte VRM) geïncubeerd onder standaard kweekomstandigheden (zie aanhangsel 2 (34) (35)). Aan het einde van de blootstellingsperiode moeten de vaste teststof en de controlestoffen zorgvuldig van het weefseloppervlak worden verwijderd door grondig te spoelen met Ca^{2+}/Mg^{2+}-vrije DPBS bij kamertemperatuur. Deze spoelstap wordt gevolgd door onderdompeling in vers medium bij kamertemperatuur (om alle in het weefsel geabsorbeerde teststof te verwijderen) gedurende een vooraf bepaalde tijd die varieert afhankelijk van de gebruikte VRM, en een na-incubatie in vers medium onder standaard kweekomstandigheden toegepast, voordat de MTT-test wordt uitgevoerd (zie aanhangsel 2 (34) (35)).

34. In elke testrun moeten gelijktijdige negatieve en positieve controles worden opgenomen om aan te tonen dat de levensvatbaarheid (bepaald met de negatieve controle) en de gevoeligheid (bepaald met de positieve controle) van de weefsels binnen de op basis van historische gegevens vastgestelde aanvaardbaarheidsgrenzen liggen. De gelijktijdige negatieve controle zorgt ook voor de baseline (100 % levensvatbaarheid) om het relatieve percentage levensvatbaarheid van de met de teststof behandelde weefsels te berekenen (%Levensvatbaarheid$_{test}$). De aanbevolen positievecontrolestof voor gebruik met de VRM's is zuiver methylacetaat (CAS RN 79-20-9, in de handel verkrijgbaar van bv. Sigma-Aldrich, cat. nr. 45997; vloeistof). De aanbevolen negatievecontrolestoffen voor gebruik met VRM1 en VRM2 zijn respectievelijk ultrazuiver H_2O en Ca^{2+}/Mg^{2+}-vrije DPBS. Dit zijn de stoffen die als controlestoffen werden gebruikt in de valideringsstudies van de VRM's en waarvoor de meeste historische gegevens beschikbaar zijn. Het gebruik van geschikte alternatieve positieve- en negatievecontrolestoffen moet afdoende wetenschappelijk gerechtvaardigd worden. De negatieve en positieve controles moeten volgens hetzelfde protocol/dezelfde protocollen worden getest als de teststoffen die in de testrun zijn opgenomen (d.w.z. voor vloeistoffen en/of voor vaste stoffen). Na het aanbrengen volgen de blootstelling aan de behandeling, spoelen, onderdompeling na de behandeling en na-incubatie, voor zover van toepassing, zoals beschreven voor controles die gelijktijdig met vloeibare teststoffen worden gerund (zie punt 32) of voor controles die gelijktijdig met vaste stoffen worden gerund (zie punt 33), alvorens

de MTT-test wordt uitgevoerd (zie punt 35) (34) (35). Een enkele set van negatieve en positieve controles is voldoende voor alle teststoffen in dezelfde testrun die dezelfde fysische toestand hebben (vloeistoffen of vaste stoffen).

Metingen van de weefsellevensvatbaarheid

35. De MTT-omzettingstest is een gestandaardiseerde kwantitatieve methode (16), en de aangewezen methode voor het meten van de weefsellevensvatbaarheid binnen deze testmethode. De test werkt goed met geconstrueerd driedimensionaal weefsel. De MTT-test wordt onmiddellijk na de na-incubatieperiode uitgevoerd. In de VRM's wordt het RhCE-weefselpreparaat gedurende 180 ± 15 min onder standaard kweekomstandigheden in 0,3 ml 1 mg/ml MTT-oplossing geplaatst. De levensvatbare cellen van het RhCE-weefselpreparaat reduceren de vitale kleurstof MTT tot een blauw MTT-formazanprecipitaat. Het neergeslagen blauwe MTT-formazanproduct wordt vervolgens met een passend volume isopropanol (of een vergelijkbaar oplosmiddel) uit het weefsel geëxtraheerd (34) (35). Bij weefsels die worden getest met vloeibare teststoffen, moet de extractie zowel aan de bovenkant als aan de onderkant van de weefsels plaatsvinden, terwijl bij weefsels die worden getest met vaste teststoffen en gekleurde vloeistoffen, de extractie enkel aan de onderkant van het weefsel moet plaatsvinden (om de kans op verontreiniging van de isopropanol-extractieoplossing met mogelijk op het weefsel achtergebleven teststof zoveel mogelijk te verkleinen). Bij weefsels die worden getest met moeilijk afwasbare teststoffen, kan ook worden gekozen voor extractie enkel aan de onderkant. De gelijktijdig geteste negatieve en positieve controlestoffen moeten op dezelfde manier worden behandeld als de geteste chemische stof. Het geëxtraheerde MTT-formazan kan worden gekwantificeerd met behulp van een meting van de standaard extinctie (OD) bij 570 nm, bij een bandbreedte van maximaal ± 30 nm, of een HPLC/UPLC-spectrofotometrieprocedure (zie punt 42) (11) (36).

36. De optische eigenschappen van de teststof of de chemische werking ervan op MTT kunnen de meting van MTT-formazan verstoren, met een foutieve bepaling van de weefsellevensvatbaarheid tot gevolg. Soms verstoren teststoffen de meting van MTT-formazan, door rechtstreekse reductie van MTT tot blauw MTT-formazan en/of door kleurinterferentie indien de teststof van nature of als gevolg van de behandelingsprocedures in hetzelfde OD-bereik absorbeert als MTT-formazan (d.w.z. rond 570 nm). Voorafgaand aan de MTT-test moeten teststoffen getoetst worden om mogelijke rechtstreeks MTT reducerende stoffen en/of stoffen die kleurinterferentie veroorzaken, te identificeren. Om mogelijke storing door deze teststoffen te detecteren en ervoor te corrigeren moeten er aanvullende controles worden uitgevoerd (zie de punten 37-41). Dit is vooral van belang als een bepaalde teststof zich niet volledig van het RhCE-weefselpreparaat laat wassen, of als de stof in het hoornvliesepitheelmodel penetreert, en de teststof daardoor in de RhCE-

weefselpreparaten aanwezig is wanneer de MTT-test wordt uitgevoerd. Voor teststoffen die (van nature of na behandeling) licht absorberen in hetzelfde bereik als MTT-formazan en niet compatibel zijn met de meting van de standaard extinctie (OD) van MTT-formazan vanwege te sterke interferentie, d.w.z. sterkte extinctie bij 570 ± 30 nm, kan wellicht een HPLC/UPLC-spectrofotometrieprocedure voor het meten van MTT-formazan worden toegepast (zie de punten 41 en 42) (11) (36). Een gedetailleerde beschrijving van hoe rechtstreekse MTT-reductie kan worden gedetecteerd en hoe ervoor kan worden gecorrigeerd, is te vinden in de SOP's voor de VRM's (34) (35). Bovendien zijn in de aanhangsels III en IV illustratieve stroomschema's opgenomen voor respectievelijk VRM1 en VRM2, die als leidraad kunnen dienen voor het identificeren en behandelen van rechtstreeks MTT reducerende stoffen en/of stoffen die kleurinterferentie veroorzaken.

37. Om na te gaan of teststoffen die (van nature of na behandeling) licht absorberen in hetzelfde bereik als MTT-formazan, de test zouden kunnen verstoren en te beslissen of er aanvullende controles nodig zijn, wordt de teststof toegevoegd aan water en/of isopropanol en voldoende tijd geïncubeerd bij kamertemperatuur (zie aanhangsel 2 (34) (35)). Als de teststof in water en/of isopropanol voldoende licht absorbeert in het bereik van 570 ± 20 nm voor VRM1 (zie aanhangsel 3) of als bij menging van de teststof met water een gekleurde oplossing wordt verkregen voor VRM2 (zie aanhangsel 4), wordt aangenomen dat de teststof de meting van de standaard extinctie (OD) van MTT-formazan verstoort en dat er hetzij extra kleurstofcontroles moeten worden uitgevoerd hetzij, als alternatief, een HPLC/UPLC-spectrofotometrieprocedure moet worden gebruikt, in welk geval deze controles niet nodig zijn (zie de punten 41 en 42) en de aanhangsels III en IV) (34) (35). Bij het uitvoeren van de meting van de standaard extinctie (OD) moet elke verstorende teststof op ten minste twee levensvatbare duploweefsels aangebracht, die de hele testprocedure doorlopen maar tijdens de MTT-incubatiestap geïncubeerd worden met medium in plaats van MTT-oplossing om zo tot een niet-specifieke kleurcontrole (NSC_{levend}-controle) te komen (34) (35). Vanwege de inherente biologische variabiliteit van levende weefsels moet de NSC_{levend}-controle gelijktijdig worden uitgevoerd met het testen van de gekleurde teststof. In geval van meerdere testen moet er voor elke test die wordt uitgevoerd (in elke testrun), een onafhankelijke NSC_{levend}-controle worden verricht. De werkelijke weefsellevensvatbaarheid wordt berekend als: de procentuele levensvatbaarheid verkregen met levende weefsels die zijn blootgesteld aan de verstorende teststof en geïncubeerd met MTT-oplossing ($\%Levensvatbaarheid_{test}$), minus het percentage niet-specifieke kleur verkregen met levende weefsels die zijn blootgesteld aan de verstorende teststof en geïncubeerd in medium zonder MTT, gelijktijdig uitgevoerd met de te corrigeren test ($\%NSC_{levend}$), d.w.z. werkelijke weefsellevensvatbaarheid = $[\%Levensvatbaarheid_{test}] - [\%NSC_{levend}]$

38. Om rechtstreeks MTT reducerende stoffen te herkennen moet elke teststof worden toegevoegd aan vers bereide MTT-oplossing. Er wordt een passende hoeveelheid teststof toegevoegd aan een MTT-oplossing en dit mengsel wordt ongeveer 3 uur geïncubeerd onder standaard kweekomstandigheden (zie de aanhangsels III en IV) (34) (35). Als het MTT-mengsel met de teststof (of de suspensie voor onoplosbare teststoffen) blauw/paars wordt, wordt de teststof als een rechtstreeks MTT reducerende stof beschouwd en moet een verdere functionele toetsing op niet-levensvatbare RhCE-weefselpreparaten worden uitgevoerd, ongeacht of de meting van de standaard extinctie (OD) of een HPLC/UPLC-spectrofotometrieprocedure wordt gebruikt. Bij deze aanvullende functionele toetsing worden gedode weefsels gebruikt die slechts een residuele metabole activiteit vertonen, maar de teststof wel absorberen en vasthouden op vergelijkbare wijze als levensvatbare weefsels. Gedode VRM1-weefsels worden bereid door blootstelling aan lage temperatuur ("door bevriezing gedood"). Gedode VRM2-weefsels worden bereid door langdurige incubatie (bv. ten minste 24 ± 1 uur) in water, gevolgd door bewaring bij lage temperatuur ("in water gedood"). Om een controle voor niet-specifieke MTT-reductie (NSMTT) te genereren wordt elke MTT reducerende teststof op ten minste twee gedode duploweefsels aangebracht, die de gehele testprocedure ondergaan (34) (35). Per teststof is één NSMTT-controle voldoende, ongeacht het aantal onafhankelijk uitgevoerde tests/testruns. De werkelijke weefsellevensvatbaarheid wordt berekend als: de procentuele levensvatbaarheid van het weefsel verkregen met levende weefsels die zijn blootgesteld aan de MTT reducerende stof (%Levensvatbaarheid$_{test}$), minus het percentage niet-specifieke MTT-reductie verkregen met de gedode weefsels die aan de zelfde MTT reducerende stof zijn blootgesteld, ten opzichte van de negatieve controle die gelijktijdig met de te corrigeren test is uitgevoerd (%NSMTT), d.w.z. werkelijke weefsellevensvatbaarheid = [%Levensvatbaarheid$_{test}$] – [%NSMTT].

39. Voor teststoffen waarvan wordt vastgesteld dat ze zowel kleurinterferentie (zie punt 37) als rechtstreekse reductie van MTT veroorzaken (zie punt 38), is naast de in de vorige punten beschreven NSMTT- en NSC$_{levend}$-controles nog een derde reeks controles nodig, wanneer de meting van de standaard extinctie (OD) wordt uitgevoerd. Dit geldt doorgaans voor donkergekleurde teststoffen die licht absorberen in het bereik van 570 ± 30 nm (bv. blauwe, paarse of zwarte stoffen), omdat hun intrinsieke kleur de beoordeling van hun vermogen om rechtstreeks MTT te reduceren zoals beschreven in punt 38 belemmert. Dit maakt een standaard gebruik van NSMTT-controles samen met NSC$_{levend}$-controles noodzakelijk. Teststoffen waarvoor zowel NSMTT-controles als NSC$_{levend}$-controles worden uitgevoerd, worden mogelijk zowel door levende als gedode weefsels geabsorbeerd en vastgehouden. Daarom corrigeert de NSMTT-controle in dit geval mogelijk niet alleen voor potentiële rechtstreekse MTT-reductie door de teststof, maar ook voor kleurinterferentie die voortkomt uit de absorptie en retentie van de teststof door de gedode weefsels. Dit

zou kunnen leiden tot een dubbele correctie voor kleurinterferentie, aangezien de NSC_{levend}-controle al voor kleurinterferentie als gevolg van de absorptie en retentie van de teststof door levende weefsels corrigeert. Om een mogelijke dubbele correctie voor kleurinterferentie te vermijden moet een derde controle voor niet-specifieke kleur in gedode weefsels (NSC_{gedood}) worden uitgevoerd (zie de aanhangsels III en IV) (34) (35). In deze extra controle wordt de teststof aangebracht op ten minste twee duplo's van gedood weefsel, die de gehele testprocedure doorlopen maar in de MTT-incubatiestap geïncubeerd worden met medium in plaats van met MTT-oplossing. Per teststof is één NSC_{gedood}-controle voldoende, ongeacht het aantal onafhankelijke tests/testruns dat wordt uitgevoerd, maar deze moet gelijktijdig worden uitgevoerd met de NSMTT-controle en met dezelfde weefselbatch. De werkelijke weefsellevensvatbaarheid wordt berekend als: de procentuele levensvatbaarheid verkregen met levende weefsels die zijn blootgesteld aan de teststof ($\%Levensvatbaarheid_{test}$) minus %NSMTT minus $\%NSC_{levend}$ plus het percentage niet-specifieke kleur verkregen met gedode weefsels die zijn blootgesteld aan de verstorende teststof en geïncubeerd met medium zonder MTT, ten opzichte van de negatieve controle die gelijktijdig met de te corrigeren test is uitgevoerd ($\%NSC_{gedood}$), d.w.z. werkelijke weefsellevensvatbaarheid = $[\%Levensvatbaarheid_{test}] - [\%NSMTT] - [\%NSC_{levend}] + [\%NSC_{gedood}]$.

40. Het is van belang op te merken dat niet-specifieke MTT-reductie en niet-specifieke kleurinterferenties de OD van het weefselextract kunnen verhogen tot buiten het lineariteitsbereik van de spectrofotometer (in het geval van standaard extinctiemetingen) en dat niet-specifieke MTT-reductie ook de piekoppervlakte voor MTT-formazan van het weefselextract kan vergroten tot buiten het lineariteitsbereik van de spectrofotometer (in het geval van HPLC/UPLC-spectrofotometriemetingen). Daarom is het van belang dat elk laboratorium, alvorens te beginnen met het testen van teststoffen met het oog op regelgeving, eerst het lineariteitsbereik van de spectrofotometer voor de OD/piekoppervlakte bepaalt met MTT-formazan (CAS RN 57360-69-7), in de handel verkrijgbaar van bv. Sigma-Adrich (cat. nr. M2003).

41. Standaard extinctiemeting (OD-meting) met een spectrofotometer is een geschikte methode voor de beoordeling van rechtstreeks MTT reducerende stoffen en teststoffen die kleurinterferentie vertonen, als de waargenomen verstoring van de meting van MTT-formazan niet te sterk is (d.w.z. als de OD's van de weefselextracten die worden verkregen met de teststof zonder correctie voor rechtstreekse MTT-reductie en/of kleurinterferentie, binnen het lineariteitsbereik van de spectrofotometer vallen). Niettemin moeten de resultaten voor teststoffen die een %NSMTT en/of een $\%NSC_{levend}$ van ≥ 60 % (VRM1 en VRM2, protocol voor vloeistoffen) of 50 % (VRM2, protocol voor vaste stoffen) van de negatieve controle opleveren, met omzichtigheid worden benaderd, aangezien dit de vastgestelde drempelwaarden zijn

die in de VRM's als scheiding tussen ingedeelde en niet-ingedeelde stoffen fungeren (zie punt 44). De standaard extinctie (OD) kan echter niet worden gemeten wanneer de verstoring van MTT-formazan te sterk is (d.w.z. de verstoring leidt ertoe dat de ongecorrigeerde OD's van de testweefselextracten buiten het lineariteitsbereik van de spectrofotometer vallen). Gekleurde teststoffen of teststoffen die gekleurd worden wanneer ze in contact komen met water of isopropanol, die de meting van de standaard extinctie (OD) van MTT-formazan te sterk verstoren, kunnen nog altijd worden beoordeeld met behulp van HPLC/UPLC-spectrofotometrie (zie aanhangsels III en IV). In het HPLC/UPLC-systeem kan het MTT-formazan namelijk van de chemische stof worden gescheiden, voordat het gekwantificeerd wordt (36). Daarom zijn er bij gebruik van HPLC/UPLC-spectrofotometrie geen NSC_{levend}- of NSC_{gedood}-controles nodig, ongeacht de geteste chemische stof. Als echter wordt vermoed dat de teststof rechtstreeks MTT reduceert, moeten er wel NSMTT-controles worden toegepast (volgens de in punt 38 beschreven procedure). NSMTT-controles moeten ook worden toegepast als van teststoffen wordt vermoed dat ze (van zichzelf of in water) een kleur hebben die de beoordeling van het vermogen om rechtstreeks MTT te reduceren (zoals beschreven in punt 38) belemmert. Bij gebruik van HPLC/UPLC-spectrofotometrie voor het meten van MTT-formazan wordt de procentuele levensvatbaarheid van het weefsel berekend als percentage van de piekoppervlakte voor MTT-formazan verkregen met levende weefsels die aan de teststof zijn blootgesteld, ten opzichte van de piekoppervlakte voor MTT-formazan verkregen met de gelijktijdige negatieve controle. Voor teststoffen die rechtstreeks MTT kunnen reduceren, wordt de weefsellevensvatbaarheid berekend als: $\%Levensvatbaarheid_{test}$ minus %NSMTT, zoals beschreven in de laatste zin van punt 38. Tot slot zij erop gewezen dat rechtstreeks MTT reducerende stoffen of rechtstreeks MTT reducerende stoffen die ook kleurinterferentie vertonen, als ze na de behandeling in de weefsels achterblijven en MTT zo sterk reduceren dat dit OD's (met standaard OD-meting) of piekoppervlakten (met HPLC/UPLC-spectrofotometrie) oplevert voor de geteste weefselextracten die buiten het lineariteitsbereik van de spectrofotometer vallen, niet met RhCE-testmethoden beoordeeld kunnen worden, hoewel dergelijke gevallen naar verwachting slechts zeer zelden voorkomen.

42. HPLC/UPLC-spectrofotometrie kan voor alle typen teststoffen (al dan niet gekleurd, al dan niet MTT reducerend) worden gebruikt voor het meten van MTT-formazan (11) (36). Vanwege de diversiteit van HPLC/UPLC-spectrofotometriesystemen is het niet mogelijk om voor elke gebruiker een precies gelijke systeemopzet te realiseren. Daarom moet de deugdelijkheid van het HPLC/UPLC-spectrofotometriesysteem worden aangetoond alvorens het wordt gebruikt voor het kwantificeren van MTT-formazan in weefselextracten, door aan de aanvaardbaarheidscriteria te voldoen voor een reeks standaard deugdelijkheidsparameters op basis van de parameters beschreven in de voor de industrie bestemde leidraad van de Amerikaanse Food and Drug

Administration voor de validering van bioanalytische methoden (36) (38). Deze kritische parameters en de bijbehorende aanvaardbaarheidscriteria worden weergegeven in aanhangsel 5. Als aan de in aanhangsel 5 gestelde aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt het HPLC/UPLC-spectrofotometriesysteem als deugdelijk beschouwd en kan het worden gebruikt voor het meten van MTT-formazan onder de experimentele omstandigheden die worden beschreven in deze testmethode.

Aanvaardbaarheidscriteria

43. Voor elke testrun met RhCE-batches die de kwaliteitscontrole hebben doorstaan (zie punt 30), moeten de weefsels die met de negatievecontrolestof zijn behandeld, een OD vertonen die overeenkomt met de kwaliteit van de weefsels na vervoer, ontvangst en alle stappen van het protocol, en die niet buiten de in tabel 2 beschreven historisch bepaalde grenzen mag liggen (zie punt 26). Evenzo moet voor weefsels die met de positievecontrolestof, d.w.z. met methylacetaat, zijn behandeld, de gemiddelde weefsellevensvatbaarheid < 50 % zijn ten opzichte van de negatieve controle in VRM1 met het protocol voor vloeistoffen of dat voor vaste stoffen, en ≤ 30 % (protocol voor vloeistoffen) of ≤ 20 % (protocol voor vaste stoffen) ten opzichte van de negatieve controle in VRM2, overeenkomend met het vermogen van de weefsels om op een irriterende teststof te reageren onder de omstandigheden van de testmethode (34) (35). De variabiliteit tussen duploweefsels voor teststoffen en controlestoffen moet binnen de aanvaardbare grenzen liggen (d.w.z. het verschil in levensvatbaarheid tussen twee duploweefsels moet kleiner zijn dan 20 % of de standaarddeviatie (SD) tussen drie duploweefsels mag niet groter zijn dan 18 %). Als de negatieve controle of de positieve controle in een testrun buiten het aanvaarde bereik valt, wordt de testrun als "ondeugdelijk" beschouwd en moet deze worden overgedaan. Als de variabiliteit tussen de duploweefsels voor een teststof buiten het aanvaardbare bereik ligt, moet de test als "ondeugdelijk" worden beschouwd en moet de teststof hertest worden.

Interpretatie van de resultaten en voorspellingsmodel

44. De OD-waarden/piekoppervlakten die zijn verkregen met de duploweefselextracten voor elke teststof, moeten worden gebruikt voor het berekenen van de gemiddelde procentuele weefsellevensvatbaarheid (gemiddelde over duploweefsels) genormaliseerd ten opzichte van de negatieve controle, die op 100 % wordt gesteld. De drempelwaarde van de procentuele weefsellevensvatbaarheid voor het identificeren van teststoffen waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is (VN-GHS/CLP Geen categorie), wordt gegeven in tabel 4. De resultaten moeten derhalve als volgt worden geïnterpreteerd:

- De teststof wordt geïdentificeerd als chemische stof waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is volgens VN-GHS/CLP Geen categorie, als de gemiddelde procentuele weefsellevensvatbaarheid na blootstelling en na-incubatie hoger is dan (>) de vastgestelde drempelwaarde van de procentuele weefsellevensvatbaarheid zoals weergegeven in tabel 4. In dat geval is het niet nodig om met andere testmethoden verder te testen.
- Als de gemiddelde procentuele weefsellevensvatbaarheid na blootstelling en na-incubatie lager is dan of gelijk aan (≤) de vastgestelde drempelwaarde van de procentuele weefsellevensvatbaarheid zoals weergegeven in tabel 4, kan er geen voorspelling worden gedaan. In dat geval zijn er verdere tests met andere testmethoden nodig, omdat de RhCE-testmethoden een zeker aantal vals-positieve resultaten laten zien (zie de punten 14-15) en geen onderscheid kunnen maken tussen de VN-GHS/CLP-categorieën 1 en 2 (zie punt 17).

Tabel 4: Voorspellingsmodellen volgens de VN-GHS en CLP-classificatie

VRM	Geen categorie	Er kan geen voorspelling worden gedaan
VRM1 - EpiOcular™ EIT (voor beide protocollen)	Gemiddelde weefsellevensvatbaarheid > 60 %	Gemiddelde weefsellevensvatbaarheid ≤ 60 %
VRM2 - SkinEthic™ HCE EIT (voor het protocol voor vloeistoffen)	Gemiddelde weefsellevensvatbaarheid > 60 %	Gemiddelde weefsellevensvatbaarheid ≤ 60 %
VRM2 - SkinEthic™ HCE EIT (voor het protocol voor vaste stoffen)	Gemiddelde weefsellevensvatbaarheid > 50%	Gemiddelde weefsellevensvatbaarheid ≤ 50%

45. Eén test bestaande uit ten minste twee duploweefsels zou voldoende moeten zijn voor een teststof, indien het resultaat ondubbelzinnig is. Echter, bij grensgevallen zoals niet-concordante metingen van duplo's en/of een gemiddelde procentuele weefsellevensvatbaarheid van 60 ± 5 % (VRM1 en VRM2, protocol voor vloeistoffen) of 50 ± 5 % (VRM2, protocol voor vaste stoffen), moet een tweede test worden overwogen, evenals een derde testrun in geval van niet-concordante resultaten tussen de eerste twee tests.

46. Indien van toepassing en gerechtvaardigd kan ter verbetering van de algemene prestaties van de testmethode voor bepaalde typen mengsels worden overwogen om verschillende drempelwaarden van de procentuele weefsellevensvatbaarheid te gebruiken als scheiding tussen geclassificeerde en niet-geclassificeerde teststoffen (zie punt 14). Voor het beoordelen van het potentieel voor ernstig oogletsel/oogirritatie van onbekende teststoffen of productklassen, of van het relatieve toxisch potentieel voor de ogen van een geclassificeerde chemische stof binnen een

bepaald spectrum van positieve responsen kan het nuttig zijn om ijkstoffen te gebruiken.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

47. Voor elke teststof moeten de gegevens van de afzonderlijke duploweefsels in een testrun (bv. OD-waarden/MTT-formazan-piekoppervlakten en berekende gegevens voor de procentuele weefsellevensvatbaarheid voor de teststoffen en controles, en de uiteindelijke voorspelling van de EhCR-testmethode) in tabelvorm in het verslag worden opgenomen, met inbegrip van gegevens uit herhaalde tests, indien van toepassing. Bovendien moeten voor elke afzonderlijke teststof en controle de gemiddelde procentuele weefsellevensvatbaarheid en het verschil in levensvatbaarheid tussen twee duploweefsels (indien n=2 duploweefsels of de SD (indien $n \geq 3$ duploweefsels) in het verslag worden opgenomen. Ook eventuele storingen van de MTT-formazanmeting door een teststof door rechtstreekse reductie van MTT en/of kleurinterferentie moeten voor elke geteste chemische stof in het verslag worden opgenomen.

Testverslag

48. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof

Stof die uit één component bestaat

- chemische identificatie, zoals IUPAC- of CAS-na(a)m(en), CAS-registratienummer(s), SMILES- of InChI-code(s), structuurformules en/of andere identificatiemiddelen;
- fysische toestand, vluchtigheid, pH, LogP, molecuulgewicht, chemische klassen en aanvullende fysisch-chemische eigenschappen die relevant zijn voor het uitvoeren van het onderzoek, voor zover beschikbaar;
- zuiverheid, chemische naam van onzuiverheden waar passend en praktisch haalbaar enz.;
- behandeling voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);
- bewaaromstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar.

Stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB en mengsel

- karakterisering, voor zover mogelijk aan de hand van bv. chemische identiteit (zie hierboven), zuiverheid, kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen (zie hierboven) van de bestanddelen, voor zover beschikbaar;
- fysische toestand en aanvullende fysisch-chemische eigenschappen die relevant zijn voor het uitvoeren van het onderzoek, voor zover beschikbaar;
- zuiverheid, chemische naam van onzuiverheden waar passend en praktisch haalbaar enz.;
- behandeling voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);
- bewaaromstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar.

Positieve- en negatievecontrolestoffen

- chemische identificatie, zoals IUPAC- of CAS-na(a)m(en), CAS-registratienummer(s), SMILES- of InChI-code(s), structuurformules en/of andere identificatiemiddelen;
- fysische toestand, vluchtigheid, molecuulgewicht, chemische klassen en aanvullende fysisch-chemische eigenschappen die relevant zijn voor het uitvoeren van het onderzoek, voor zover beschikbaar;
- zuiverheid, chemische naam van onzuiverheden waar passend en praktisch haalbaar enz.;
- behandeling voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);
- bewaaromstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar;
- rechtvaardiging voor het gebruik van een andere negatieve controle dan ultrazuiver H_2O of Ca^{2+}/Mg^{2+}-vrije DPBS, indien van toepassing;
- rechtvaardiging voor het gebruik van een andere positieve controle dan zuiver methylacetaat, indien van toepassing;
- verwijzing naar historische positieve- en negatievecontroleresultaten waaruit de geschiktheid van de aanvaardbaarheidscriteria voor de testrun blijkt.

Informatie met betrekking tot de opdrachtgever en de testinstallatie

- naam en adres van de opdrachtgever, testinstallatie en de onderzoeksleider.

RhCE-weefselpreparaat en gebruikt protocol (met motivering voor keuzes, indien van toepassing)

Omstandigheden van de testmethode

- het gebruikte RhCE-weefselpreparaat, met inbegrip van het batchnummer;
- golflengte en bandbreedte (indien van toepassing) die voor het kwantificeren van MTT-formazan zijn gebruikt, en lineariteitsbereik van de meetapparatuur (bv. spectrofotometer);
- een beschrijving van de methode die voor het kwantificeren van MTT-formazan is gebruikt;
- een beschrijving van het gebruikte HPLC/UPLC-spectrofotometriesysteem, indien van toepassing;
- volledige ondersteunende informatie over het specifieke gebruikte RhCE-weefselpreparaat, met inbegrip van de deugdelijkheid daarvan. Hieronder moet ten minste informatie zijn over:
    i) levensvatbaarheid bij kwaliteitscontrole (QC) (leverancier);
    ii) levensvatbaarheid onder de omstandigheden van de testmethode (gebruiker);
    iii) barrièrefunctie bij QC;
    iv) morfologie, voor zover gegevens beschikbaar zijn;
    v) reproduceerbaarheid en voorspellend vermogen;
    vi) andere QC-gegevens over het RhCE-weefselpreparaat, indien beschikbaar;
- verwijzingen naar historische gegevens over het RhCE-weefselpreparaat. Hieronder moet ten minste informatie zijn over: de aanvaardbaarheid van de QC-gegevens met verwijzing naar historische batchgegevens;
- verklaring dat voorafgaand aan het routinematig gebruik van de testmethode de bekwaamheid van de testfaciliteit in de toepassing ervan is aangetoond door middel van het testen van de chemische stoffen voor bekwaamheidstoetsing.

Aanvaardbaarheidscriteria voor de test en testruns

- gemiddelden van de positieve en negatieve controles en aanvaardbaarheidsbereiken op basis van historische gegevens;
- aanvaardbare variabiliteit tussen de duploweefsels voor de positieve en negatieve controles;
- aanvaardbare variabiliteit tussen de duploweefsels voor de teststof.

Testprocedure

- gedetailleerde informatie over de gebruikte testprocedure;
- de gebruikte doses van de teststof en de controlestoffen;
- duur en temperatuur van de blootstellings-, onderdompelings- (na de blootstelling) en na-incubatieperioden (voor zover van toepassing);

- een beschrijving van eventuele wijzigingen van de testprocedure;
- indicatie van de controles die zijn gebruikt voor rechtstreeks MTT-reducerende stoffen en/of gekleurde teststoffen, indien van toepassing;
- het aantal gebruikte duploweefsels per teststof en controles (positieve controle, negatieve controle en NSMTT, NSC_{levend} en NSC_{gedood}, indien van toepassing).

Resultaten

- een tabel met gegevens voor afzonderlijke teststoffen en controlestoffen, voor elke testrun (met inbegrip van herhalingen, voor zover van toepassing) en elke duplometing met inbegrip van OD-waarde of MTT-formazan-piekoppervlakte, procentuele levensvatbaarheid van de weefsels, gemiddelde procentuele levensvatbaarheid van de weefsels, verschil tussen duploweefsels of SD en de uiteindelijke voorspelling;
- indien van toepassing: resultaten van de gebruikte controles voor rechtstreeks MTT reducerende stoffen en/of gekleurde teststoffen, met inbegrip van OD-waarde of MTT-formazan-piekoppervlakte, %NSMTT, $\%NSC_{levend}$, $\%NSC_{gedood}$, verschil tussen duploweefsels of SD, de uiteindelijke gecorrigeerde procentuele weefsellevensvatbaarheid, en de uiteindelijke voorspelling;
- resultaten verkregen met de teststof(fen) en controlestoffen ten opzichte van de vastgestelde aanvaardbaarheidscriteria voor de test en testruns;
- een beschrijving van andere waargenomen effecten, bv. verkleuring van de weefsels door een gekleurde teststof.

Bespreking van de resultaten

Conclusie

LITERATUUR

(1) VN (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York en Genève: Verenigde Naties. Beschikbaar op: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Hoofdstuk B.5 van deze bijlage, Acute oogirritatie/-corrosie.

(3) Hoofdstuk B.47 van deze bijlage, Bovine Corneal Opacity and Permeability-(BCOP-)testmethode voor de identificatie van i) chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken en ii) chemische stoffen waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is.

(4) Hoofdstuk B.48 van deze bijlage, Isolated Chicken Eye-testmethode voor de identificatie van i) chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken en ii) chemische stoffen waarvoor classificatie niet nodig is.

(5) Hoofdstuk B.61 van deze bijlage, Fluoresceïnelekkage-testmethode voor de identificatie van voor het oog corrosieve en hevig irriterende stoffen.

(6) Hoofdstuk B.68 van deze bijlage, in-vitrotestmethode met korte blootstelling voor de identificatie van i) chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken en ii) chemische stoffen waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is.

(7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010, 261-266.

(8) EC EURL CEVMA (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Beschikbaar op: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280.

(9) Raadgevend wetenschappelijk comité van het EURL CEVMA (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Beschikbaar op: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702.

(10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.

(11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.

(12) Raadgevend wetenschappelijk comité van het EURL CEVMA (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28175 EN; doi : 10.2787/390390. Beschikbaar op: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704.

(13) EC EURL CEVMA (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Manuscript in voorbereiding).

(14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. Journal of *Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.

(15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

(16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(17) OESO (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference

Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(18) OESO (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.

(20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, pp. 147-159.

(21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619-626.

(22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476-1488.

(23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.

(24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

(25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.

(26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.

(27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N.and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.

(28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.

(29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922-936.

(30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.

(31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115-130.

(32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610-2625.

(33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41-54.

(34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Beschikbaar op:

[https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

(35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Versie 1. (20 juli 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Beschikbaar op: https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index.

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.

(37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.

(38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Mei 2001. Beschikbaar op: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf.

(39) OESO (2017). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Serious Eye Damage and Eye Irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Afw.: afwijking.

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een testmethode, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden uitgevoerd. De betrouwbaarheid wordt beoordeeld door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid en intralaboratoriumherhaalbaarheid (18).

Bewijskracht(proces): het proces waarbij de sterke en zwakke punten van verschillende gegevens worden onderzocht bij het komen tot en ondersteunen van een conclusie met betrekking tot het gevarenpotentieel van een teststof.

Bottom-upbenadering: een trapsgewijze benadering die gebruikt wordt voor een teststof waarvan wordt vermoed dat classificatie en etikettering voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is, die begint met het onderscheiden van chemische stoffen waarvoor classificatie en etikettering niet nodig is (negatief resultaat) van andere chemische stoffen (positief resultaat).

Chemische stof: een stof of een mengsel.

Concordantie: zie "Nauwkeurigheid".

CV: variatiecoëfficiënt.

EIT: oogirritatietest (Eye Irritation Test).

Ernstig oogletsel: het ontstaan van veranderingen in het oog na het aanbrengen van een teststof op het oppervlak aan de voorzijde van het oog, die binnen 21 dagen na het aanbrengen volledig omkeerbaar zijn. Verwisselbaar met "Onomkeerbare effecten op ogen" en met "VN-GHS/CLP-categorie 1".

ET_{50}: de blootstellingstijd die nodig is om de weefsellevensvatbaarheid met 50 % te doen dalen bij aanbrenging van een ijkstof in een bepaalde, vaste concentratie.

EURL-CEVMA: referentielaboratorium van de Europese Unie voor alternatieve methoden ter vervanging van dierproeven.

Gevaar: inherente eigenschap van een agens of situatie die nadelige effecten kan veroorzaken als een organisme, systeem of (sub)populatie aan dit agens wordt blootgesteld.

Geldige testmethode: een testmethode die voldoende relevant en betrouwbaar wordt geacht voor een specifiek doel en gebaseerd is op wetenschappelijk verantwoorde beginselen. Een testmethode is nooit algemeen geldig, maar enkel met betrekking tot een specifiek doel (18).

Gevalideerde testmethode: een testmethode waarvoor valideringsstudies zijn gedaan om de relevantie (inclusief nauwkeurigheid) en betrouwbaarheid voor een bepaald doel te bepalen. Er moet worden opgemerkt dat een gevalideerde testmethode niet per definitie voldoende nauwkeurig en betrouwbaar is om aanvaardbaar te worden bevonden voor het voorgestelde doel (18).

Gevoeligheid: het percentage van alle positieve/actieve teststoffen dat door de test correct wordt ingedeeld. Dit is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert en is een belangrijke factor voor de beoordeling van de relevantie van een testmethode (18).

GHS (mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen van de Verenigde Naties (VN)): een systeem voor de indeling van chemische stoffen (stoffen en mengsels) op basis van gestandaardiseerde soorten en niveaus van gevaren van fysische aard en gevaren voor de gezondheid en het milieu, en dat de desbetreffende voorlichtingselementen bepaalt, zoals pictogrammen, signaalwoorden, gevarenaanduidingen, voorzorgsmaatregelen en veiligheidsinformatiebladen, waarmee informatie over de schadelijke effecten van de stoffen kenbaar wordt gemaakt teneinde mensen (waaronder werkgevers, werknemers, transporteurs, consumenten en spoedhulpverleners) en het milieu te beschermen (1).

HCE: SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (menselijk hoornvliesepitheel).

Hoornvlies: het doorschijnende gedeelte van het voorste deel van de oogbal dat de iris en pupil bedekt en licht naar binnen toelaat.

HPLC: hogeprestatievloeistofchromatografie.

IC_{50}: de concentratie te bepalen waarin een ijkstof de weefsellevensvatbaarheid het weefsel met 50 % doet dalen na een vaste blootstellingstijd (bv. 30 minuten behandeling met SDS).

IJkstof: een stof die wordt gebruikt als norm voor vergelijking met een teststof. Een ijkstof moet de volgende eigenschappen hebben: i) (een) constante en betrouwbare bron(nen) voor de identificatie en karakterisering ervan; ii) in structureel, functioneel en/of chemisch opzicht of qua productklasse soortgelijk aan de geteste chemische stof(fen); iii) bekende fysisch-chemische eigenschappen; iv) ondersteunende gegevens met betrekking tot bekende effecten; en v) bekende potentie binnen het bereik van de gewenste respons.

LLOQ: onderste bepaalbaarheidsgrens (Lower Limit of Quantification).

LogP: logaritme van de octanol-water-verdelingscoëfficiënt.

Mengsel: een mengsel of oplossing bestaande uit twee of meer stoffen.

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromide; thiazolylblauw tetrazoliumbromide.

Nauwkeurigheid: de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de

testmethode en erkende referentiewaarden. Het is een maat voor de prestaties van de testmethode en één aspect van "relevantie". Deze term en de term "concordantie", waaronder het percentage correcte uitkomsten van een testmethode wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt (18).

Negatieve controle: een monster met alle bestanddelen van een testsysteem dat met een stof behandeld werd waarvan bekend is dat deze in het testsysteem geen positieve respons opwekt. Dit monster wordt samen met de met de teststof behandelde monsters en andere controlemonsters verwerkt en wordt gebruikt voor het vaststellen van 100 % weefsellevensvatbaarheid.

Niet ingedeeld: stoffen die niet zijn geclassificeerd voor oogirritatie (VN-GHS/CLP-categorie 2, VN-GHS-categorie 2A of 2B) of ernstig oogletsel (VN-GHS/CLP-categorie 1). Verwisselbaar met "VN-GHS/CLP Geen categorie".

NSC_{gedood}: niet-specifieke kleur in gedode weefsels.

NSC_{levend}: niet-specifieke kleur in levende weefsels.

NSMTT: niet-specifieke MTT-reductie.

OD: optische dichtheid.

Omkeerbare effecten op ogen: zie "Oogirritatie".

Oneindige dosis: hoeveelheid op het RhCE-weefselpreparaat aangebrachte teststof die groter is dan de hoeveelheid die nodig is om het epitheeloppervlak volledig en gelijkmatig te bedekken.

Onomkeerbare effecten op ogen: zie "Ernstig oogletsel".

Oogirritatie: veranderingen in het oog na het aanbrengen van een teststof op het oppervlak aan de voorzijde van het oog, die binnen 21 dagen na het aanbrengen volledig omkeerbaar zijn. Verwisselbaar met "Omkeerbare effecten op ogen" en met "VN-GHS/CLP-categorie 2".

Percentage vals-negatieve uitslagen: het percentage van alle positieve stoffen dat door de testmethode onterecht als negatief wordt geïdentificeerd. Het is één indicator van de prestaties van de testmethode.

Percentage vals-positieve uitslagen: het percentage van alle negatieve stoffen dat door een testmethode onterecht als positief wordt geïdentificeerd. Het is één indicator van de prestaties van de testmethode.

Positieve controle: een monster met alle bestanddelen van een testsysteem dat met een stof behandeld werd waarvan bekend is dat deze in het testsysteem een positieve respons opwekt. Dit monster wordt samen met de met de teststof behandelde monsters en andere controlemonsters verwerkt. Om te verzekeren dat variabiliteit in de positievecontrolerespons

doorheen de tijd kan worden beoordeeld, mag de grootte van de positieve respons niet buitensporig zijn.

Prestatienormen: normen, gebaseerd op een gevalideerde, wetenschappelijk geldig bevonden testmethode, die de basis vormen voor de beoordeling van de vergelijkbaarheid van een voorgestelde, in mechanistisch en functioneel opzicht gelijksoortige testmethode. Hieronder begrepen zijn: i) essentiële componenten van de testmethode; ii) een minimumlijst van referentiestoffen die zijn gekozen uit de stoffen die zijn gebruikt om de aanvaardbare prestaties van de gevalideerde testmethode aan te tonen; en iii) de vergelijkbare nauwkeurigheids- en betrouwbaarheidsniveaus die door de voorgestelde testmethode moeten worden gehaald wanneer ze worden beoordeeld aan de hand van de minimumlijst van referentiestoffen; deze waarden zijn gebaseerd op de waarden die voor de gevalideerde testmethode zijn verkregen (18).

Relevantie: beschrijving van het verband van de test met het te onderzoeken effect en of de test betekenis heeft en nuttig is voor een bepaald doel. Het is de mate waarin de test het te onderzoeken biologische effect correct meet of voorspelt. Relevantie omvat een beoordeling van de nauwkeurigheid (concordantie) van een testmethode (18).

Reproduceerbaarheid: de overeenkomst tussen resultaten verkregen uit herhaalde tests op dezelfde chemische stof met behulp van hetzelfde testprotocol (zie "Betrouwbaarheid") (18).

RhCE: gereconstrueerd model van menselijk hoornvliesepitheel (Reconstructed human Cornea-like Epithelium).

SD: standaarddeviatie.

Specificiteit: het percentage van alle negatieve/inactieve teststoffen dat door de test correct wordt ingedeeld. Dit is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert en is een belangrijke factor voor de beoordeling van de relevantie van een testmethode (18).

Standard Operating Procedures (SOP): formele schriftelijke procedures waarin uitvoerig wordt beschreven hoe specifieke routinematige en testspecifieke laboratoriumhandelingen moeten worden uitgevoerd. Ze zijn verplicht voor GLP.

Stof: een chemisch element en de verbindingen ervan, zoals zij voorkomen in natuurlijke toestand of bij de productie ontstaan, met inbegrip van alle additieven die nodig zijn voor het behoud van de stabiliteit ervan en alle onzuiverheden ten gevolge van het toegepaste procedé, doch met uitzondering van elk oplosmiddel dat kan worden afgescheiden zonder aantasting van de stabiliteit van de stof of wijziging van de samenstelling ervan.

Stof die uit één component bestaat: een stof die wordt gekenmerkt door haar kwantitatieve samenstelling en waarin een hoofdcomponent aanwezig is in een concentratie van ten minste 80 % (w/w).

Stof die uit meerdere componenten bestaat: een stof die wordt gekenmerkt door haar

kwantitatieve samenstelling en waarin meer dan één hoofdcomponent aanwezig is in een concentratie van ≥ 10 % (w/w) en < 80 % (w/w). Een stof die uit meerdere componenten bestaat, is het resultaat van een fabricageproces. Het verschil tussen mengsels en stoffen die uit meerdere componenten bestaan, is dat mengsels worden verkregen door twee of meer stoffen zonder chemische reactie met elkaar te vermengen. Een stof die uit meerdere componenten bestaat, is het resultaat van een chemische reactie.

Test: één teststof die gelijktijdig wordt getest op ten minste twee duploweefsels zoals gedefinieerd in de overeenkomstige SOP.

Testrun: een testrun bestaat uit een of meer teststoffen die gelijktijdig worden getest met een negatieve en een positieve controle.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

Top-downbenadering: een trapsgewijze benadering die wordt gebruikt voor een chemische stof waarvan wordt vermoed dat deze ernstig oogletsel veroorzaakt, die begint met het onderscheiden van chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken (positief resultaat) van andere chemische stoffen (negatief resultaat).

Trapsgewijze teststrategie: een teststrategie waarbij opeenvolgende testmethoden worden gebruikt. Alle bestaande informatie over een teststof op elke trap wordt herbezien aan de hand van een proces op basis van bewijskracht om te bepalen of er voldoende informatie beschikbaar is voor een beslissing tot gevarenclassificatie, vooraleer wordt overgegaan tot de volgende trap in de strategie. Als op een bepaalde trap op basis van de bestaande informatie het mogelijke gevaar/de potentie van een teststof kan worden bepaald, zijn er geen verdere tests nodig (18).

ULOQ: bovenste bepaalbaarheidsgrens (Upper Limit of Quantification).

UPLC: ultrahogeprestatievloeistofchromatografie.

UVCB: stoffen met een onbekende of variabele samenstelling, complexe reactieproducten en biologische materialen.

Vervangende test: een test, ontworpen ter vervanging van een voor de identificatie van gevaren en/of risicobeoordeling geaccepteerde en routinematig gebruikte test, waarvan is vastgesteld dat hij, in vergelijking met de geaccepteerde test, de gezondheid van mens of dier of het milieu, naargelang het geval, gelijke of betere bescherming biedt voor alle mogelijke testsituaties en chemische stoffen (18).

VN-GHS/CLP-categorie 1: zie "Ernstig oogletsel".

VN-GHS/CLP-categorie 2: zie "Oogirritatie".

VN-GHS/CLP Geen categorie: chemische stoffen die niet voldoen aan de criteria voor classificatie in VN-GHS-categorie 1 of 2 (2A of 2B). Verwisselbaar met "Niet ingedeeld".

VRM: gevalideerde referentiemethode.

VRM1: de EpiOcular™ EIT wordt aangeduid als gevalideerde referentiemethode 1.

VRM2: de SkinEthic™ HCE EIT wordt aangeduid als gevalideerde referentiemethode 2.

Weefsellevensvatbaarheid: een parameter waarmee de totale activiteit van een celpopulatie in een gereconstrueerd weefsel wordt gemeten als het vermogen om de vitale kleurstof MTT te reduceren, die, afhankelijk van het gemeten eindpunt en de opzet van de test, is gecorreleerd met het totale aantal en/of de vitaliteit van de levende cellen.

Aanhangsel 2

HOOFDCOMPONENTEN VAN DE RHCE-TESTS DIE ZIJN GEVALIDEERD VOOR DE IDENTIFICATIE VAN CHEMISCHE STOFFEN WAARVOOR CLASSIFICATIE EN ETIKETTERING VOOR OOGIRRITATIE OF ERNSTIG OOGLETSEL NIET NODIG IS

Testcomponenten	**EpiOcular™ EIT (VRM1)**		**SkinEthic™ HCE EIT (VRM2)**	
Protocollen	Vloeistoffen (gedurende 15 minuten pipetteerbaar bij temperaturen van 37 ± 1 °C of lager)	Vaste stoffen (niet pipetteerbaar)	Vloeistoffen en viskeuze stoffen (pipetteerbaar)	Vaste stoffen (niet pipetteerbaar)
Oppervlak van het model	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Aantal duploweefsels	Ten minste 2	Ten minste 2	Ten minste 2	Ten minste 2
Voorafgaande toetsing op kleurinterferentie	50 µl + 1 ml H_2O gedurende 60 min bij 37 ± 2 ºC, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH (niet-gekleurde teststoffen), of 50 µl + 2 ml isopropanol gemengd gedurende 2-3 uur bij RT (gekleurde teststoffen) → als de OD van de teststof bij 570 ± 20 nm na aftrek van de OD voor isopropanol of water > 0,08 is (wat overeenkomt met ongeveer 5 % van de gemiddelde OD van de negatieve controle), moeten er aangepaste controles met levende weefsels worden uitgevoerd.	50 mg + 1 ml H_2O gedurende 60 min bij 37 ± 2 ºC, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH (niet-gekleurde teststoffen) en/of 50 mg + 2 ml isopropanol gemengd gedurende 2-3 uur bij RT (gekleurde en niet-gekleurde teststoffen) → als de OD van de teststof bij 570 ± 20 nm na aftrek van de OD voor isopropanol of water > 0,08 is (wat overeenkomt met ongeveer 5 % van de gemiddelde OD van de negatieve controle), moeten er aangepaste controles met levende weefsels worden	10 µl + 90 µl H_2O gemengd gedurende 30 ± 2 min bij RT (18-28 ºC) → als de teststof gekleurd is, moeten er aangepaste controles met levende weefsels worden uitgevoerd	10 mg + 90 µl H_2O gemengd gedurende 30 ± 2 min bij RT → als de teststof gekleurd is, moeten er aangepaste controles met levende weefsels worden uitgevoerd

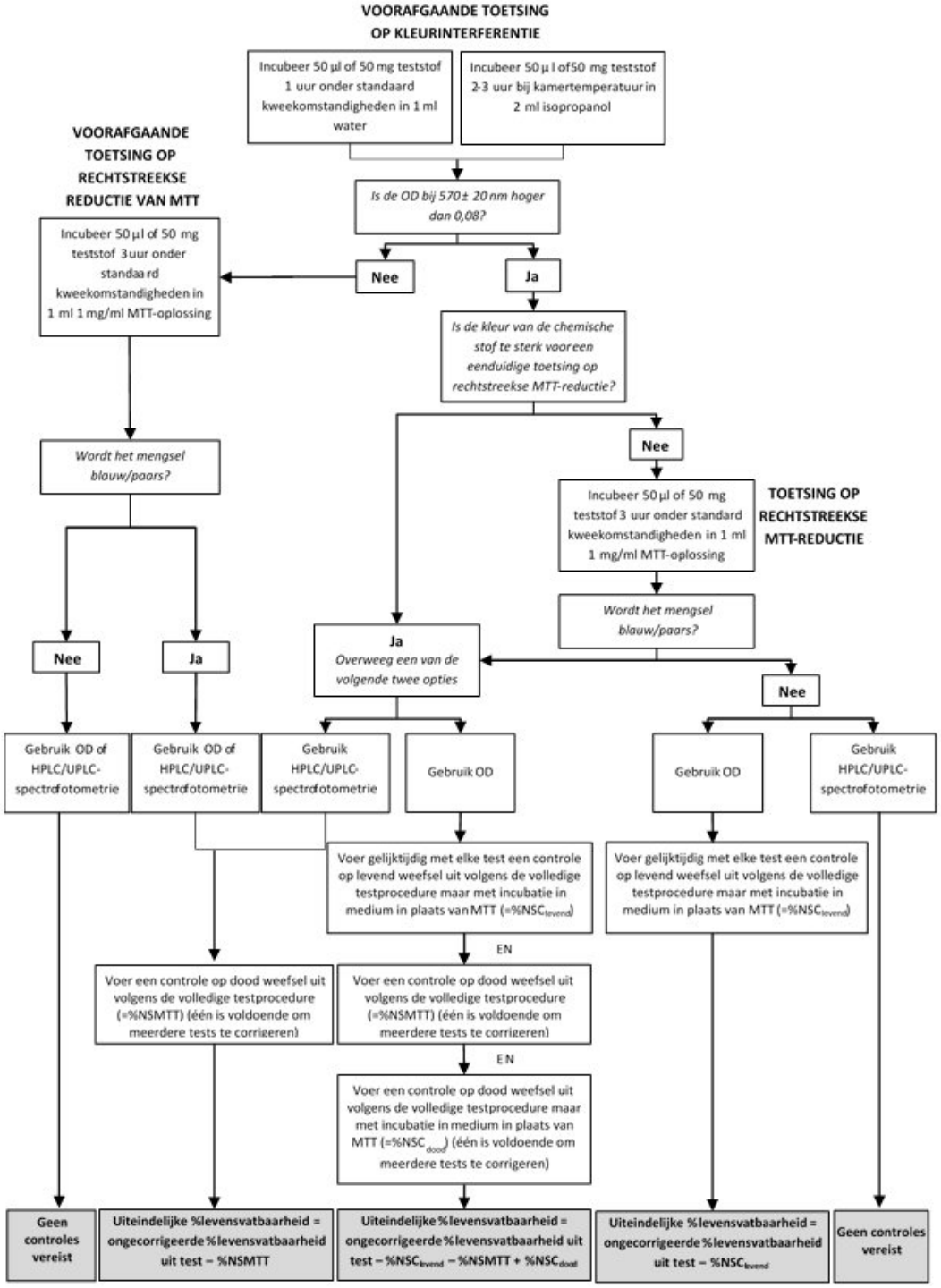
Testcomponenten	EpiOcular™ EIT (VRM1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM2)	
		uitgevoerd.		
Voorafgaande toetsing op rechtstreekse MTT-reductie	50 µl + 1 ml van een 1 mg/ml MTT-oplossing gedurende 180 ± 15 min bij 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH → als de oplossing blauw/paars wordt, moeten er aangepaste controles met door bevriezing gedode weefsels worden uitgevoerd (als negatieve controle wordt 50 µl steriel gedeïoniseerd water in MTT-oplossing gebruikt)	50 mg + 1 ml van een 1 mg/ml MTT-oplossing gedurende 180 ± 15 min bij 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH → als de oplossing blauw/paars wordt, moeten er aangepaste controles met door bevriezing gedode weefsels worden uitgevoerd (als negatieve controle wordt 50 µl steriel gedeïoniseerd water in MTT-oplossing gebruikt)	30 µl + 300 µl van een 1 mg/ml MTT-oplossing gedurende 180 ± 15 min bij 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH → als de oplossing blauw/paars wordt, moeten er aangepaste controles met in water gedode weefsels worden uitgevoerd (als negatieve controle wordt 30 µl steriel gedeïoniseerd water in MTT-oplossing gebruikt)	30 mg + 300 µl van een 1 mg/ml MTT-oplossing gedurende 180 ± 15 min bij 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH → als de oplossing blauw/paars wordt, moeten er aangepaste controles met in water gedode weefsels worden uitgevoerd (als negatieve controle wordt 30 µl steriel gedeïoniseerd water in MTT-oplossing gebruikt)
Voorbehandeling	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-vrije DPBS gedurende 30 ± 2 min bij 37 ± 2ºC, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH, beschermd tegen het licht.	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-vrije DPBS gedurende 30 ± 2 min bij 37 ± 2ºC, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH, beschermd tegen het licht.	-	-
Doses van de behandeling en wijze van aanbrengen	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) met behulp van een gekalibreerd instrument (bv. een afgestreken maatlepel die is gekalibreerd op een inhoud van 50 mg natriumchloride).	10 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-vrije DPBS + 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) Gebruik voor viskeuze stoffen nylongaas	30 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-vrije DPBS + 30 ± 2 mg (60 mg/cm^2)
Blootstellingstijd en -temperatuur	30 min (± 2 min) in kweekmedium bij 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	6 uur (± 0,25 uur) in kweekmedium bij 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	30 min (± 2 min) in kweekmedium bij 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	4 uur (± 0,1 uur) in kweekmedium bij 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH
Spoelen bij kamertemperatuur	3 maal in 100 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-vrije DPBS	3 maal in 100 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-vrije DPBS	20 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-vrije DPBS	25 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-vrije DPBS

Testcomponenten	EpiOcular™ EIT (VRM1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM2)	
Onderdompeling na blootstelling	12 min (± 2 min) bij RT in kweekmedium	25 min (± 2 min) bij RT in kweekmedium	30 min (± 2 min) bij 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH in kweekmedium	30 min (± 2 min) bij RT in kweekmedium
Na-incubatie	120 min (15 min) in kweekmedium bij 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	18 uur (± 0,25 uur) in kweekmedium bij 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	geen	18 uur (± 0,5 uur) in kweekmedium bij 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH
Negatieve controle	50 µl H_2O Gelijktijdig getest	50 µl H_2O Gelijktijdig getest	30 ± 2 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-vrije DPBS Gelijktijdig getest	30 ± 2 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-vrije DPBS Gelijktijdig getest
Positieve controle	50 µl methylacetaat Gelijktijdig getest	50 µl methylacetaat Gelijktijdig getest	30 ± 2µl methylacetaat Gelijktijdig getest	30 ± 2µl methylacetaat Gelijktijdig getest
MTT-oplossing	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT-incubatieduur en -temperatuur	180 min (± 15 min) bij 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min) bij 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min) bij 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min) bij 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH
Extractievloeistof	2 ml isopropanol (extractie van boven- en onderkant van inzetstuk door het weefsel door te prikken)	2 ml isopropanol (extractie van onderkant van inzetstuk door het weefsel door te prikken)	1,5 ml isopropanol (extractie van boven- en onderkant van inzetstuk)	1,5 ml isopropanol (extractie van onderkant van inzetstuk)
Extractieduur en -temperatuur	2-3 uur onder schudden (~ 120 rpm) bij RT of gedurende een nacht bij 4-10 °C	2-3 uur onder schudden (~ 120 rpm) bij RT of gedurende een nacht bij 4-10 °C	4 uur onder schudden (~ 120 rpm) bij RT of ten minste gedurende een nacht zonder schudden bij 4-10 °C	Ten minste 2 uur onder schudden (~ 120 rpm) bij RT
OD-meting	570 nm (550 - 590 nm) zonder referentiefilter	570 nm (550 - 590 nm) zonder referentiefilter	570 nm (540 - 600 nm) zonder referentiefilter	570 nm (540 - 600 nm) zonder referentiefilter
Weefselkwaliteitscontrole	Behandeling met 100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Behandeling met 100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	30 min behandeling met SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	30 min behandeling met SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

Testcomponenten	EpiOcular™ EIT (VRM1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM2)	
Aanvaardbaarheidscriteria	1. De gemiddelde OD van de duploweefsels behandeld met de negatieve controle moet > 0,8 en < 2,5 zijn 2. De gemiddelde levensvatbaarheid van de duploweefsels die gedurende 30 min zijn blootgesteld aan de positieve controle, uitgedrukt als % van de negatieve controle, moet < 50 % zijn 3. Het verschil in levensvatbaarheid tussen twee duploweefsels moet kleiner zijn dan 20 %.	1. De gemiddelde OD van de duploweefsels behandeld met de negatieve controle moet > 0,8 en < 2,5 zijn 2. De gemiddelde levensvatbaarheid van de duploweefsels die gedurende 6 uur zijn blootgesteld aan de positieve controle, uitgedrukt als % van de negatieve controle, moet < 50 % zijn 3. Het verschil in levensvatbaarheid tussen twee duploweefsels moet kleiner zijn dan 20 %.	1. De gemiddelde OD van de duploweefsels behandeld met de negatieve controle moet > 1,0 en ≤ 2,5 zijn 2. De gemiddelde levensvatbaarheid van de duploweefsels die gedurende 30 min zijn blootgesteld aan de positieve controle, uitgedrukt als % van de negatieve controle, moet ≤ 30 % zijn 3. Het verschil in levensvatbaarheid tussen twee duploweefsels moet kleiner zijn dan 20 %.	1. De gemiddelde OD van de duploweefsels behandeld met de negatieve controle moet > 1,0 en ≤ 2,5 zijn 2. De gemiddelde levensvatbaarheid van de duploweefsels die gedurende 4 uur zijn blootgesteld aan de positieve controle, uitgedrukt als % van de negatieve controle, moet ≤ 20 % zijn 3. Het verschil in levensvatbaarheid tussen twee duploweefsels moet kleiner zijn dan 20 %.

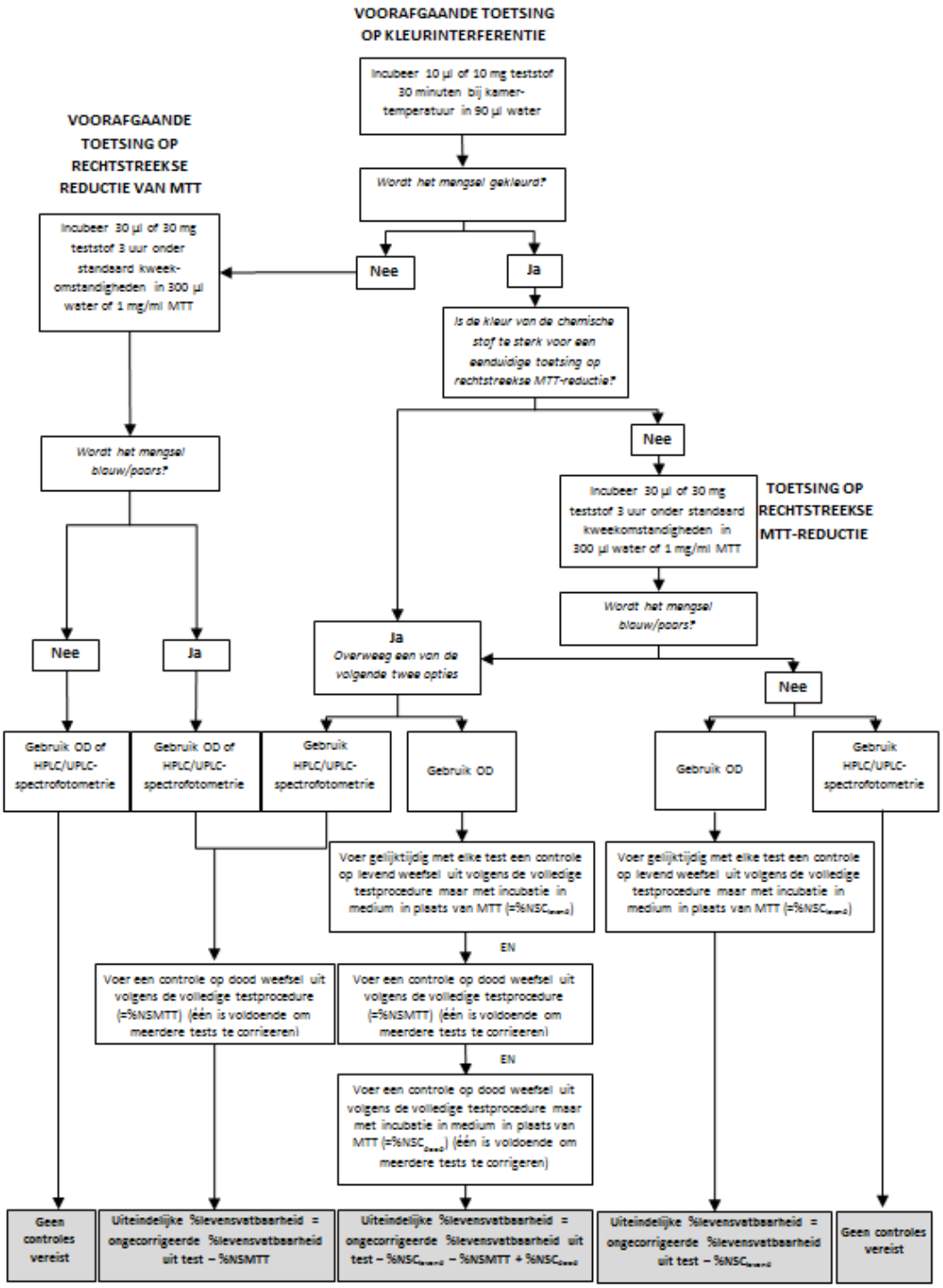
Aanhangsel 3

ILLUSTRATIEF STROOMSCHEMA DAT ALS LEIDRAAD KAN DIENEN VOOR HET IDENTIFICEREN EN BEHANDELEN VAN RECHTSTREEKS MTT REDUCERENDE STOFFEN EN/OF STOFFEN DIE KLEURINTERFERENTIE VEROORZAKEN, OP BASIS VAN DE SOP VOOR VRM1



Aanhangsel 4

ILLUSTRATIEF STROOMSCHEMA DAT ALS LEIDRAAD KAN DIENEN VOOR HET IDENTIFICEREN EN BEHANDELEN VAN RECHTSTREEKS MTT REDUCERENDE STOFFEN EN/OF STOFFEN DIE KLEURINTERFERENTIE VEROORZAKEN, OP BASIS VAN DE SOP VOOR VRM2



Aanhangsel 5

KRITISCHE PARAMETERS EN AANVAARDBAARHEIDSCRITERIA VOOR KWALIFICATIES VAN EEN HPLC/UPLC-SPECTROFOTOMETRIESYSTEEM VOOR METING VAN UIT RHCE-WEEFSELPREPARATEN GEËXTRAHEERD MTT-FORMAZAN

Parameter	Protocol ontleend aan FDA-leidraad (36) (38)	Aanvaardbaarheidscriteria
Selectiviteit	Analyse van isopropanol, levende blanco (isopropanolextract van onbehandelde levende RhCE-weefselpreparaten), dode blanco (isopropanolextract van onbehandelde gedode RhCE-weefselpreparaten) en een kleurstof (bv. methyleenblauw)	$Oppervlakte_{interferentie}$ ≤ 20 % van $Oppervlakte_{LLOQ}$[1]
Precisie	Kwaliteitscontroles (d.w.z. MTT-formazan bij 1,6 µg/ml, 16 µg/ml en 160 µg/ml) in isopropanol (n=5)	CV ≤ 15 % of ≤ 20 % voor de LLOQ
Nauwkeurigheid	Kwaliteitscontroles in isopropanol (n=5)	%Afw. ≤ 15 % of ≤ 20 % voor de LLOQ
Matrixeffect	Kwaliteitscontroles in levende blanco (n=5)	85 % ≤ %Matrixeffect ≤ 115 %
Carry-over	Analyse van isopropanol na een ULOQ[2]-standaard	$Oppervlakte_{interferentie}$ ≤ 20 % van $Oppervlakte_{LLOQ}$
Reproduceerbaarheid (binnen één dag)	3 onafhankelijke kalibratiecurven (op basis van 6 achtereenvolgende 1/3 verdunningen van MTT-formazan in isopropanol beginnend bij de ULOQ, d.w.z. 200 µg/ml); Kwaliteitscontroles in isopropanol (n=5)	Kalibratiecurven: %Afw. ≤ 15 % of ≤ 20 % voor de LLOQ Kwaliteitscontroles: %Afw. ≤ 15 % en CV ≤ 15 %
Reproduceerbaarheid (van dag tot dag)	Dag 1: 1 kalibratiecurve en kwaliteitscontroles in isopropanol (n=3) Dag 2: 1 kalibratiecurve en kwaliteitscontroles in isopropanol (n=3) Dag 3: 1 kalibratiecurve en kwaliteitscontroles in isopropanol (n=3)	
Kortetermijnstabiliteit van MTT-formazan in RhCE-weefselextract	Kwaliteitscontroles op levende blanco (n=3) geanalyseerd op de dag van bereiding en na 24 uur bewaring bij kamertemperatuur	%Afw. ≤ 15 %
Langetermijnstabiliteit van MTT-formazan in RhCE-weefselextract, indien nodig	Kwaliteitscontroles op levende blanco (n=3) geanalyseerd op de dag van bereiding en na een aantal dagen bewaring bij –20 °C	%Afw. ≤ 15 %

[1] LLOQ: onderste bepaalbaarheidsgrens (Lower Limit of Quantification), gedefinieerd als overeenkomend met 1-2 % levensvatbaarheid van het weefsel, d.w.z. 0,8 µg/ml.

[2] ULOQ: bovenste bepaalbaarheidsgrens (Upper Limit of Quantification), gedefinieerd als ten minste tweemaal zo hoog als de hoogste verwachte MTT-formazanconcentratie in isopropanolextracten van negatieve controles (~70 µg/ml in de VRM), d.w.z. 200 µg/ml.

B.70 IN-VITROBEPALINGEN MET EEN MENSELIJKE RECOMBINANTE OESTROGEENRECEPTOR (hrER) VOOR HET OPSPOREN VAN CHEMISCHE STOFFEN MET ER-BINDINGSAFFINITEIT

ALGEMENE INLEIDING

Op prestaties gebaseerde testrichtlijn van de OESO

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 493 (2015) van de OESO. TG 493 is een op prestaties gebaseerde testrichtlijn (performance-based test guideline, PBTG), waarin de methodologie wordt beschreven voor menselijke recombinante in-vitrobepalingen (hrER) voor het opsporen van stoffen met oestrogeenreceptorbindingsaffiniteit (hrER-bindingsbepalingen). De PBTG omvat twee, in mechanistisch en functioneel opzicht gelijksoortige bepalingen voor het identificeren van oestrogeenreceptor-α-binders (ERα-binders) en moet de ontwikkeling bevorderen van nieuwe gelijksoortige of gewijzigde testmethoden die overeenstemmen met de valideringsbeginselen beschreven in de OESO-leidraad voor de validering en internationale aanvaarding van nieuwe of bijgewerkte bepalingen voor gevarenbeoordeling (Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment) (1) De volledig gevalideerde referentietestmethoden (aanhangsels 2 en 3) die de basis vormen voor deze op prestaties gebaseerde testmethode zijn:

   - de in-vitrobepaling van de binding aan de oestrogeenreceptor (ER) met een volledige menselijke recombinante ERα van Freyberger en Wilson (FW-bepaling) (2); en
   - de in-vitrobepaling van de binding aan de oestrogeenreceptor met een menselijk recombinant ligandbindingsdomein-eiwit van het Japanse Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI-bepaling) (2).

   Er zijn prestatienormen (3) beschikbaar om de ontwikkeling en validering van soortgelijke testmethoden voor het zelfde gevareneindpunt te vergemakkelijken en tijdige wijziging van PBTG 493 mogelijk te maken, zodat nieuwe, gelijksoortige bepalingen aan een bijgewerkte PBTG kunnen worden toegevoegd. Gelijksoortige testbepalingen zullen evenwel pas worden toegevoegd nadat de OESO ze heeft beoordeeld en onderschrijft dat aan de prestatienormen wordt voldaan. De in TG 493 opgenomen bepalingen kunnen zonder onderscheid worden gebruikt om te voldoen aan de eisen die aan OESO-landen worden gesteld wat betreft de testresultaten voor oestrogeenreceptorbinding, en in aanmerking te komen voor wederzijdse aanvaarding van gegevens in overeenstemming met de OESO-overeenkomst.

Achtergrond en beginselen van de bepalingen die in deze testmethode worden beschreven

2. In 1998 is de OESO met hoge prioriteit een actie gestart om bestaande testrichtlijnen te herzien en nieuwe testrichtlijnen te ontwikkelen voor het screenen en testen op potentiële

hormoonontregelaars. Het conceptueel kader van de OESO voor het testen en beoordelen van hormoonontregelende stoffen werd in 2012 herzien. Het oorspronkelijke en het herziene conceptueel kader zijn als bijlagen opgenomen bij de leidraad voor gestandaardiseerde testrichtlijnen voor de beoordeling van chemische stoffen op hormoonontregeling (Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption) (4). Het conceptueel kader omvat vijf niveaus, die elk overeenkomen met een ander niveau van biologische complexiteit. De in deze testmethode beschreven ER-bindingsbepalingen zijn ingedeeld op niveau 2: "*in-vitrobepalingen die gegevens moeten opleveren over (een) geselecteerde endocriene mechanisme(n)/weg(en)"*. Deze testmethode betreft in-vitroreceptorbindingsbepalingen die zijn ontworpen voor het identificeren van liganden voor de menselijke oestrogeenreceptor-alfa (ERα).

3. De relevantie van de in-vitro-ER-bindingsbepaling voor biologische functies is genoegzaam aangetoond. ER-bindingsbepalingen zijn ontworpen voor het identificeren van chemische stoffen die in staat zijn het signaalpad van oestrogene hormonen te verstoren. Ze worden al twee decennia breed toegepast voor het karakteriseren van de weefseldistributie van ER's en het identificeren van ER-agonisten/antagonisten. Deze bepalingen berusten op de interactie tussen ligand en receptor, die de eerste stap vormt van het signaalpad van oestrogenen en essentieel is voor de voortplantingsfunctie van alle gewervelden.

4. De interactie van oestrogenen met ER's kan de transcriptie van oestrogeengestuurde genen beïnvloeden en niet-genomische effecten veroorzaken, wat kan leiden tot de inductie of remming van processen in de cel, waaronder de processen die nodig zijn voor celproliferatie, de normale ontwikkeling van de foetus en de voortplantingsfunctie (5) (6) (7). Verstoring van de normale oestrogene systemen zou kunnen leiden tot schadelijke effecten op de normale ontwikkeling (ontogenese), de reproductieve gezondheid en de integriteit van het voortplantingsstelsel. Een verstoorde ER-signalering kan leiden tot effecten als een verhoogd risico van hormoonafhankelijke kanker, een verstoorde vruchtbaarheid en afwijkingen in de groei en ontwikkeling van de foetus (8).

5. In-vitro-bindingsbepalingen zijn gebaseerd op een directe interactie van een stof met de ligandbindingsplaats van een specifieke receptor die de gentranscriptie reguleert. De voornaamste component van de bindingsbepaling met een menselijke recombinante oestrogeenreceptor-alfa (hrERα) meet het vermogen van een radioactief gelabelde ligand ([^{3}H]17β-oestradiol) om aan de ER te binden in aanwezigheid van oplopende concentraties van een teststof (een "competitor"). Teststoffen met een hoge affiniteit voor de ER concurreren in een lagere concentratie met de radioactief gelabelde ligand dan chemische stoffen met een lagere affiniteit voor de receptor. Deze bepaling heeft twee hoofdcomponenten: een bepaling van de verzadigingsbinding om de parameters van de receptor-ligandinteractie te bepalen en de ER-specificiteit te documenteren, gevolgd door

een bepaling van de competitieve binding die de concurrentie tussen een teststof en een radioactief gelabelde ligand om binding aan de ER karakteriseert.

6. De relevantie en de betrouwbaarheid van de CERI-bindingsbepaling en de FW-bindingsbepaling voor het beoogde doel zijn aangetoond in de valideringsstudies voor deze bepalingen (2).

7. De in deze testmethode gebruikte definities en afkortingen staan in aanhangsel 1.

Toepassingsgebied en beperkingen voor de receptorbindingsbepalingen

8. Deze bepalingen worden aangereikt ten behoeve van screening en prioritering, maar kunnen ook informatie verschaffen voor een moleculaire inleidende gebeurtenis die kan worden gebruikt in een benadering met meervoudige bewijsvoering ("weight of evidence"-benadering). De bepalingen berusten op de chemische binding aan het ligandbindingsdomein van de ERα in een in-vitrosysteem. De resultaten mogen dan ook niet rechtstreeks geëxtrapoleerd worden naar de complexe signalering en regulering van het intacte endocriene systeem in vivo.

9. De binding van de natuurlijke ligand, 17β-oestradiol, is de eerste stap in een reeks moleculaire gebeurtenissen die de transcriptie van doelgenen activeert en uiteindelijk uitmondt in een fysiologische verandering (9). Binding aan het ligandbindingsdomein van de ERα wordt daarom beschouwd als een van de voornaamste mechanismen voor ER-gemedieerde hormoonontregeling, hoewel er ook andere mechanismen zijn waardoor hormoonontregeling kan optreden, waaronder i) interacties met andere delen van de ERα dan de ligandbindingsplaats, ii) interacties met andere receptoren die bij het signaalpad van oestrogenen betrokken zijn, de ERβ en de G-proteïnegekoppelde ER, andere receptoren en enzymsystemen in het endocriene systeem, iii) hormoonsynthese, iv) metabole activering en/of inactivering van hormonen, v) verdeling van hormonen naar doelweefsels, en vi) klaring van hormonen uit het lichaam. In geen van de bepalingen die onder deze testmethode vallen, worden deze werkingsmechanismen in aanmerking genomen.

10. Deze testmethode richt zich op het vermogen van stoffen om aan de menselijke ERα te binden en maakt geen onderscheid tussen ERα-agonisten en ERα-antagonisten. Gebeurtenissen die op deze binding volgen, zoals gentranscriptie of fysiologische veranderingen, worden door deze bepalingen evenmin in aanmerking genomen. Aangezien bij de validering alleen zuivere stoffen zijn gebruikt die uit één bestanddeel bestaan, zijn er geen gegevens over de toepasbaarheid voor testmengsels. De bepalingen zijn in theorie evenwel toepasbaar voor het testen van stoffen die uit meerdere componenten bestaan en van mengsels. Voordat de testmethode wordt gebruikt op een mengsel om gegevens te genereren voor een beoogd regelgevingsdoel, moet worden nagegaan of, en zo ja, waarom deze methode betrouwbare resultaten oplevert voor dat doel. Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is.

11. De celvrije receptorsystemen hebben geen eigen metaboliseringscapaciteit en zijn niet gevalideerd in combinatie met metabole enzymactiviteit. Niettemin zou het mogelijk kunnen zijn om metabole activiteit in de opzet van een studie te integreren, maar dit zou wel nadere validering vereisen.

12. Chemische stoffen die het eiwit (d.w.z. receptoreiwit) kunnen denatureren, zoals oppervlakteactieve stoffen of chemische stoffen die de pH van de testbuffer veranderen, kunnen mogelijk niet worden getest of alleen bij concentraties waarbij dergelijke interacties niet optreden. In andere gevallen wordt het concentratiebereik waarin een teststof in deze bepalingen kan worden getest, beperkt door oplosbaarheid ervan in de testbuffer.

13. Ter informatie worden in tabel 1 de testresultaten weergegeven voor de 24 stoffen die zijn getest in beide volledig gevalideerde bepalingen die in deze testmethode worden beschreven. Op basis van de gepubliceerde verslagen, waaronder in-vitrobepalingen voor de transcriptionele activatie van de ER en/of de uterotrofe test, zijn 17 van deze stoffen ingedeeld als ER-binders en 6 als niet-binders (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Wat betreft de gegevens die zijn weergegeven in tabel 1 was er bijna 100 % overeenstemming tussen de beide bepalingen over de indeling van alle stoffen tot een concentratie van 10^{-4} M, en elke stof werd correct ingedeeld als ER-binder of niet-ER-binder. Nadere informatie over deze groep stoffen en over de aanvullende stoffen die tijdens de valideringsstudies voor de ER-bindingsbepalingen getest zijn, is te vinden in de prestatienormen voor de hrER-bindingsbepaling (3), aanhangsel 2 (tabellen 1, 2 en 3).

Tabel 1: Indeling van stoffen als ER-binders of niet-ER-binders op basis van de FW- en CERI-hrER-bindingsbepalingen, vergeleken met de verwachte respons

	Naam van de stof	CAS RN	Verwachte respons	FW-bepaling		CERI-bepaling		Chemische klasse volgens de MeSH	Productcategorie
				Concentratie-bereik (M)	Indeling	Concentratie-bereik (M)	Indeling		
1	17β-Oestradiol	50-28-2	*Binder*	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Binder	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Binder	Steroïde	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
2	Noretynodrel	68-23-5	*Binder*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Binder	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Binder	Steroïde	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
3	Norethisteron	68-22-4	*Binder*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Binder	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Binder	Steroïde	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
4	Di-*n*-butylftalaat	84-74-2	*Niet-binder**	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Niet-binder*†	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Niet-binder*†	Koolwaterstof (cyclisch), ester	Weekmaker, chemisch tussenproduct
5	DES	56-53-1	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Koolwaterstof (cyclisch), fenol	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
6	17α-Ethinylestradiol	57-63-6	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Steroïde	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
7	*meso*-Hexestrol	84-16-2	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Koolwaterstof (cyclisch), fenol	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
8	Genisteïne	446-72-0	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Koolwaterstof (cyclisch), flavonoïde	Natuurlijk product
9	Equol	531-95-3	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Fyto-oestrogeenmetaboliet	Natuurlijk product
10	Butylparabeen (*n*-butyl-4-hydroxy-benzoaat)	94-26-8	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Parabeen	Conserveermiddel
11	Nonylfenol (mengsel)	84852-15-3	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Alkylfenol	Tussenproduct
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Organische chloorverbinding	Insecticide
13	Corticosteron	50-22-6	*Niet-binder**	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Niet-binder	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Niet-binder	Steroïde	Natuurlijk product
14	Zearalenon	17924-92-4	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Koolwaterstof (cyclisch), lacton	Natuurlijk product
15	Tamoxifen	10540-29-1	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Koolwaterstof (cyclisch)	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
16	5α-dihydrotestosteron	521-18-6	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Steroïde, niet-fenolverbinding	Natuurlijk product
17	Bisfenol A	80-05-7	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Fenol	Chemisch tussenproduct
18	4-*n*-heptylfenol	1987-50-4	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Onduidelijk [a]	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Alkylfenol	Tussenproduct
19	Kepone (Chloordecon)	143-50-0	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Koolwaterstof (gehalogeneerd)	Pesticide

20	Benzo[*a*]antra-ceen	56-55-3	*Niet-binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Niet-binder [b]	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Niet-binder [b]	Aromatische koolwaterstof	Tussenproduct
21	Enterolacton	78473-71-9	*Binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Fyto-oestrogeen	Natuurlijk product
22	Progesteron	57-83-0	*Niet-binder**	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Niet-binder	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Niet-binder	Steroïde	Natuurlijk product
23	Octyltriëthoxy-silaan	2943-75-1	*Niet-binder*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Niet-binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Niet-binder	Silaan	Oppervlakmodificator
24	Atrazine	1912-24-9	*Niet-binder**	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Niet-binder	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Niet-binder	Heterocyclische verbinding	Herbicide

*Oplosbaarheidsgrens < 1×10^{-4} M.

*Het gebruik en de indeling van di-*n*-butylftalaat (DBP) als niet-binder werden gebaseerd op tests bij concentraties tot 10^{-4} M, omdat sommige laboratoria tijdens de prevalideringsstudies hebben waargenomen dat de stof onoplosbaar is bij 10^{-3} M (bv. troebelheid).

† Tijdens de valideringsstudie werd di-*n*-butylftalaat (DBP) bij concentraties tot 10^{-3} M getest als gecodeerde teststof. Onder die omstandigheden namen sommige laboratoria een afname in de binding van de radioactief gelabelde ligand bij de hoogste concentratie (10^{-3} M) waar en/of een onzeker verloop van de curve. Voor deze testruns werd DBP door 3/5 laboratoria aan de hand van de CERI-bepaling en door 5/6 laboratoria aan de hand van de FW-bepaling als 'onduidelijk' of als 'binder' ingedeeld (zie referentie (2), secties IV.B.3a, b en VI.A).

[a] Indeling kwam niet overeen met verwachte indeling. Doordat 4-*n*-heptylfenol door 3/5 laboratoria als 'onduidelijk' of 'niet-binder' werd ingedeeld, is de gemiddelde indeling uitgekomen op 'onduidelijk'. Bij nadere inspectie bleek dat dit te wijten was aan een beperkte chemische oplosbaarheid, waardoor geen volledige bindingscurve kon worden verkregen.

[b]Tijdens de valideringsstudie werd de indeling van benzo[*a*]antraceen veranderd in 'niet-binder' (d.w.z. negatief) op basis van de gepubliceerde literatuur waarin wordt aangetoond dat de gerapporteerde oestrogene activiteit in vitro voor deze stof (16) voornamelijk afhankelijk is van de metabole activering ervan (17)(18). In de celvrije hrER-bindingsbepalingen zoals die in de interlaboratorium-valideringsstudies worden toegepast, is geen enzymatische metabole activering van de stof te verwachten. Wanneer deze stof wordt gebruikt onder de experimentele omstandigheden van de FW-bepaling en de CERI-bepaling, is de juiste indeling dan ook die van 'niet-binder'.

COMPONENTEN VAN DE hrER-BINDINGSBEPALING

Essentiële componenten van de bepaling

14. Deze testmethode is van toepassing op bepalingen waarbij gebruikgemaakt wordt van een ER-receptor en een ligand die voldoende sterk aan de receptor bindt. Deze ligand kan als marker/tracer voor de bepaling worden gebruikt en kan worden verdreven met oplopende concentraties van de teststof. De twee hoofdcomponenten van bindingsbepalingen zijn: 1) verzadigingsbinding en 2) competitieve binding. De bepaling van de verzadigingsbinding wordt gebruikt ter bevestiging van de specificiteit en de activiteit van de receptorpreparaten en aan de hand van de competitievebindingsbepaling wordt het vermogen van de teststof om aan de hrER te binden beoordeeld.

Controles

15. De keuze van het referentie-oestrogeen en de controles, die gelijktijdig worden getest, moet worden onderbouwd. Gelijktijdige controles (oplosmiddel (vehiculum), positief (ER-binder; sterke en zwakke affiniteit) en negatief (niet-binder)), voor zover van toepassing, dienen als indicatie dat de bepaling werkt onder de testomstandigheden, en zorgen dat de verschillende

experimenten met elkaar vergeleken kunnen worden. Ze maken doorgaans deel uit van de aanvaardbaarheidscriteria voor een bepaald experiment (1). Tijdens elke testrun moeten volledige concentratiecurven voor het referentie-oestrogeen en de controles (d.w.z. zwakke binder en niet-binder) in één plaat worden gebruikt. Alle andere platen moeten het volgende bevatten: i) een hoge concentratie (nagenoeg volledige verdrijving van de radioactief gelabelde ligand) en een middelhoge concentratie (bij benadering de IC^{50}) van zowel E2 als de zwakke binder in drievoud; ii) oplosmiddelcontrole en niet-specifieke binding, elk in drievoud.

Standaard kwaliteitscontroleprocedures

16. Voor elke bepaling moeten de standaard kwaliteitscontroleprocedures worden uitgevoerd zoals beschreven, om er zeker van te zijn dat de receptoren actief zijn, dat de chemische concentraties kloppen en dat de tolerantiegrenzen gedurende meerdere herhaalde bepalingen stabiel blijven, en het vermogen behouden om doorheen de tijd de verwachte ER-bindingsresponsen te geven.

Aantoning van de bekwaamheid van laboratoria

17. Alvorens onbekende chemische stoffen te testen met een van de bepalingen die onder deze testmethode vallen, moet elk laboratorium zijn bekwaamheid in het gebruik van de bepaling aantonen door verzadigingsbepalingen uit te voeren, ter bevestiging van de specificiteit en de activiteit van het ER-preparaat, en competitievebindingsbepalingen met het referentie-oestrogeen en de controles (zwakke binder en niet-binder). Het laboratorium moet een historische databank aanleggen met resultaten voor het referentie-oestrogeen en de controles, die zijn gegenereerd met 3-5 onafhankelijke, op verschillende dagen uitgevoerde experimenten. Deze experimenten zullen de basis vormen voor het referentie-oestrogeen en de historische controle voor het laboratorium en zullen mede worden gebruikt om de aanvaardbaarheid van de bepaling te beoordelen voor toekomstige testruns.

18. Door het testen van de in tabel 2 genoemde stoffen voor bekwaamheidstoetsing wordt ook de responsiviteit van het testsysteem bevestigd. De lijst van stoffen voor bekwaamheidstoetsing is een subset van de referentiestoffen die worden aangegeven in de prestatienormen voor de ER-bindingsbepalingen (3). Deze stoffen zijn in de handel verkrijgbaar, vertegenwoordigen chemische klassen waarbij doorgaans sprake is van ER-bindende activiteit, vertonen een geschikt potentiebereik voor de verwachte potentie van ER-binders (d.w.z. sterke tot zwakke binders) en niet-binders (d.w.z. negatieven). Voor elke stof voor bekwaamheidstoetsing moeten de geteste concentraties het bereik in tabel 2 bestrijken. Er moeten voor elke stof ten minste drie experimenten worden uitgevoerd en de resultaten moeten overeenstemmen met de verwachte chemische activiteit. Elk experiment moet onafhankelijk (d.w.z. met verse verdunningen van receptor, chemische stoffen en reagens) worden verricht, met elke concentratie in drievoud. De bekwaamheid wordt aangetoond door een correcte indeling (positief/negatief) van elke stof. De bekwaamheidstoetsing moet worden uitgevoerd door elke onderzoeker die de bepalingen leert.

Tabel 2: Lijst van controles en stoffen voor bekwaamheidstoetsing voor de competitieve hrER-bindingsbepalingen[1]

Nr.	Naam van de stof	CAS RN[2]	Verwachte respons[3,4]	Testconcentratiebereik (M)	Chemische klasse volgens de MeSH[5]	Productcategorie[6]
Controles (referentie-oestrogeen, zwakke binder, niet-binder)						
1	17β-Oestradiol	50-28-2	Binder	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Steroïde	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
2	Noretynodrel (of) Norethisteron	68-23-5 (of) 68-22-4	Binder	$3 \times 10^{-9} – 30 \times 10^{-6}$	Steroïde	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
3	Octyltriëthoxysilaan	2943-75-1	Niet-binder	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Silaan	Oppervlakmodificator
Stoffen voor bekwaamheidstoetsing[6]						
4	Diëthylstilboestrol	56-53-1	Binder	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Koolwaterstof (cyclisch), fenol	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
5	17α-Ethinylestradiol	57-63-6	Binder	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Steroïde	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
6	*meso*-Hexestrol	84-16-2	Binder	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Koolwaterstof (cyclisch), fenol	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
7	Tamoxifen	10540-29-1	Binder	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Koolwaterstof (cyclisch)	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
8	Genisteïne	446-72-0	Binder	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Heterocyclische verbinding, flavonoïde,	Natuurlijk product
9	Bisfenol A	80-05-7	Binder	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Fenol	Chemisch tussenproduct
10	Zearalenon	17924-92-4	Binder	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-3}$	Heterocyclische verbinding, lacton	Natuurlijk product

11	Butylparabeen	94-26-8	Binder	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-3}$	Carbonzuur, fenol	Conserveermiddel
12	Atrazine	1912-24-9	Niet-binder	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Heterocyclische verbinding	Herbicide
13	Di-*n*-butylftalaat (DBP)[7]	84-74-2	Niet-binder[8]	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-4}$	Koolwaterstof (cyclisch), ester	Weekmaker, Chemisch tussenproduct
14	Corticosteron	50-22-6	Niet-binder	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-4}$	Steroïde	Natuurlijk product

[1]Als een stof voor bekwaamheidstoetsing niet meer in de handel verkrijgbaar is, mag een stof met dezelfde indeling voor ER-binding en een vergelijkbare potentie en chemische klasse worden gebruikt.

[2]Afkortingen: CAS RN = registratienummer van de Chemical Abstracts Service.

[3]Indeling als (niet-)ERα-binder in de valideringsstudie voor de CERI- en FW-hrER-bindingsbepalingen (2).

[4]De ER-bindende activiteit is gebaseerd op de Background Review Documents (BRD) van het ICCVAM over bepalingen voor ER-binding en TA (9) en empirische gegevens en andere informatie uit de gepubliceerde en gereviewde onderzoeken die zijn geraadpleegd (10) (11) (12) (13) (14) (15).

[5]De stoffen werden ingedeeld in een of meer chemische klassen aan de hand van de Medical Subject Headings (MeSH) van de Amerikaanse National Library of Medicine, een internationaal erkend gestandaardiseerd classificatiesysteem (beschikbaar op: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

[6]De stoffen werden ingedeeld in een of meer productcategorieën aan de hand van de Hazardous Substances Data Bank van de Amerikaanse National Library of Medicine (beschikbaar op: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

[7] DPB kan als alternatieve niet-bindende controle worden gebruikt, wanneer wordt getest met een maximumconcentratie van 10^{-4} M.

[8]De oplosbaarheidsgrens voor deze stof is 10^{-4} M. Het gebruik en de indeling van di-*n*-butylftalaat (DBP) als niet-binder zijn gebaseerd op tests bij concentraties tot 10^{-4} M, omdat sommige laboratoria tijdens de prevalideringsstudies hebben waargenomen dat de stof onoplosbaar is bij 10^{-3} M (bv. troebelheid).

Bepaling van de oplosbaarheid en het concentratiebereik van teststoffen

19. Er moet voor elke stof een inleidende test worden verricht om de oplosbaarheidsgrens vast te stellen en om het passende concentratiebereik te bepalen dat bij de uitvoering van de test moet worden aangehouden. De oplosbaarheidsgrens van elke teststof wordt eerst bepaald in het oplosmiddel en nader bevestigd onder de omstandigheden van de bepaling. De uiteindelijk in de bepaling te testen concentratie mag niet hoger zijn dan 1 mM. De bereikbepalingstest bestaat uit een oplosmiddelcontrole samen met een logaritmische reeks van acht verdunningen, beginnend bij de maximaal aanvaardbare concentratie (bv. 1 mM of lager, afhankelijk van de oplosbaarheidsgrens), waarbij de aanwezigheid van troebelheid of neerslag moet worden opgemerkt. In het tweede en het derde experiment moeten de concentraties voor zover nodig worden aangepast om de concentratie-responscurve beter te kunnen karakteriseren.

Aanvaardbaarheidscriteria voor de testrun

20. Of een testrun aanvaard of verworpen wordt, hangt af van de beoordeling van de resultaten voor het referentie-oestrogeen en de controle die voor elk experiment worden gebruikt. Allereerst moeten voor plaat 1 de volledige concentratiecurven voor de referentiecontroles die in elk experiment worden verkregen, voldoen aan de prestatiemaatstaven op basis van de curvefittingsparameters (bv. IC_{50} en Hill-coëfficiënt) die voortvloeien uit de gerapporteerde resultaten voor de protocollen van de CERI-bepaling en de FW-bepaling (aanhangsels 2 en 3), en de historische controlegegevens van het laboratorium dat de test verricht. Voor elk experiment moeten alle controles (referentie-oestrogeen, zwakke binder en niet-binder) correct zijn ingedeeld. Ten tweede moeten de controles op alle andere platen worden beoordeeld op overeenkomst met plaat 1. Er moet een voldoende breed concentratiebereik van de teststof worden gebruikt om de top van de competitievebindingscurve duidelijk te kunnen bepalen. De variabiliteit tussen de duplo's van elke concentratie van de teststof en tussen de drie onafhankelijke testruns moet binnen redelijke grenzen blijven en wetenschappelijk verdedigbaar zijn. Het laboratorium moet aantonen de bepaling consistent te kunnen uitvoeren door een historische databank van het referentie-oestrogeen en de controles op te zetten en bij te houden. Als maatstaf voor de intralaboratoriumreproduceerbaarheid kunnen de standaarddeviaties (SD) of variatiecoëfficienten (CV) van de gemiddelden van de curvefittingsparameters voor het referentie-oestrogeen en de zwakkebindercontrole van meerdere experimenten worden gebruikt. De resultaten van de plaatcontroles van elke testrun en voor elke teststof moeten worden geëvalueerd op basis van professioneel oordeel.

Bovendien moet aan de volgende beginselen in verband met de aanvaardbaarheidscriteria worden voldaan:

- de gegevens moeten volstaan voor een kwantitatieve beoordeling van de ER-binding;
- de geteste controles moeten binnen het oplosbaarheidsbereik van de teststof blijven.

Analyse van de gegevens

21. Voor de analyse van de gegevens voor verzadigingsbinding en competitieve binding moet een procedure worden vastgesteld die voldoet aan de grondbeginselen voor de karakterisering van receptor-ligand-interacties. De gegevens voor verzadigingsbinding worden doorgaans geanalyseerd aan de hand van een niet-lineaireregressiemodel dat zowel de totale als de niet-specifieke binding in aanmerking neemt. Bij de bepaling van B_{max}- en K_d-gegevens kan het nodig zijn om een correctie voor liganddepletie toe te passen (bv. Swillens, 1995 (19)). De gegevens voor competitieve binding worden doorgaans getransformeerd (bv. percentage specifieke binding en concentratie van de teststof (log M)). De log(IC_{50}) van elke teststof moet worden geschat met behulp van software voor niet-lineaire fitting van de curve die geschikt is voor het fitten van een Hill-vergelijking met vier parameters. Na een eerste analyse worden de curvefittingsparameters bepaald en wordt visueel geverifieerd hoe goed de bindingsgegevens overeenkomen met de gegenereerde competitievebindingscurve. In sommige gevallen kan voor een optimaal gefitte curve een aanvullende analyse nodig zijn (bv. door de top en/of de basis van de curve te begrenzen, de regel van 10 % toe te passen, zie aanhangsel 4 en referentie 2 (sectie III.A.2).

22. Als aan de aanvaardbaarheidscriteria (punt 20) wordt voldaan, betekent dit weliswaar dat het systeem van de bepaling naar behoren functioneert, maar wil dit nog niet zeggen dat een bepaalde test kloppende gegevens produceert. Het reproduceren van de correcte resultaten van de eerste test is de beste indicatie dat de geproduceerde gegevens kloppen.

Algemene criteria voor gegevensinterpretatie

23. Er is op vooralsnog geen algemeen erkende methode voor het interpreteren van ER-bindingsgegevens, maar kwalitatieve (bv. binder/niet-binder) en/of kwantitatieve (bv. logIC_{50}, relatieve bindingsaffiniteit (RBA) enz.) beoordelingen van ER-gemedieerde activiteit moeten wel stoelen op empirische gegevens en wetenschappelijk verantwoorde afwegingen.

Testverslag

24. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Bepaling:

- de gebruikte bepaling;

Controle-/referentie-/teststof:

- bron, partijnummer, uiterste gebruiksdatum, indien beschikbaar;
- stabiliteit van de teststof, indien bekend;
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel, indien bekend;

- meting van pH, osmolaliteit en neerslag in het kweekmedium waaraan de teststof werd toegevoegd, indien van toepassing.

Stof die uit één component bestaat:

- fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water en aanvullende relevante fysisch-chemische eigenschappen;
- chemische identificatie, zoals IUPAC- of CAS-naam, CAS-nummer, SMILES- of InChI-code; structuurformule, zuiverheid, chemische identiteit of onzuiverheden, voor zover van toepassing en praktisch haalbaar enz.

Stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB's en mengsels:

- voor zover mogelijk, karakterisering aan de hand van chemische identiteit (zie hierboven), kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen van de bestanddelen.

Oplosmiddel/vehiculum:

- karakterisering (aard, leverancier en partij);
- motivering voor de keuze van het oplosmiddel/vehiculum;
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/vehiculum, indien bekend.

Receptoren:

- bron van de receptoren (leverancier, catalogusnummer, partij, type receptor, door de leverancier opgegeven concentratie actieve receptoren, certificering van de leverancier);
- karakterisering van de receptoren (o.a. resultaten verzadigingsbinding): K^d, B_{max},
- wijze van bewaren van de receptoren.
- *Radioactief gelabelde ligand:*
- leverancier, catalogusnummer, partij, specifieke activiteit.

Testomstandigheden:

- bepekte oplosbaarheid onder testomstandigheden;
- samenstelling van de bindingsbuffer;
- concentratie van de receptor;
- concentratie van de tracer (d.w.z. de radioactief gelabelde ligand);
- concentraties van de teststof;
- percentage vehiculum in de definitieve bepaling;
- incubatietemperatuur en -tijd;

- methode voor het scheiden van gebonden en vrije liganden;
- positieve en negatieve controles/referentiestoffen;
- criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is.

Aanvaardbaarheidscontrole:

- werkelijke waarden van de IC_{50} en de Hill-coëfficiënt voor de gelijktijdige positieve controles/referentiestoffen.

Resultaten:

- ruwe gegevens en gegevens over gebonden/vrije liganden;
- denatureringscontrole, indien uitgevoerd;
- in voorkomend geval, de laagste effectieve concentratie (LEC);
- RBA- en/of IC_{50}-waarden, indien van toepassing;
- indien mogelijk het verband tussen concentratie en respons;
- statistische analyses, indien uitgevoerd, samen met een maat voor de fout en de betrouwbaarheid (bv. standaardfout van het gemiddelde, standaarddeviatie, variatiecoëfficiënt of 95 %-betrouwbaarheidsinterval) en beschrijving van de wijze waarop deze waarden zijn verkregen.

Bespreking van de resultaten:

- toepassing van de regel van 10 %.

Conclusie

LITERATUUR

(1) OESO (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(2) OESO (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(3) OESO (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(4) OESO (2012). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: p.20-6.

(6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr*. Relat. Cancer., 16(4): p. 1073-89.

(7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol*. Lab. Med., 135(1): p. 63-6.

(8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, Endo Rev 30(4):293-342.

(9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

(10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 225-231.

(13) OESO (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. p. 1-188.

(15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, Toxicol. Letters, 146: 111-120.

(16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol.* Letters, 180: 213-221.

(17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol*., 196: 58-67.

(18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. Chemosphere, 34: 835-848.

(19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, Mol Pharmacol 47(6):1197-1203.

Aanhangsel 1

DEFINITIES EN AFKORTINGEN

Aanvaardbaarheidscriteria: minimumnormen voor de prestaties van experimentele controles en referentiestandaarden. Wil een experiment geldig zijn, dan moet aan alle aanvaardbaarheidscriteria worden voldaan.

Bekwaamheid: het bewezen vermogen om een bepaling naar behoren uit te voeren alvorens over te gaan tot het testen van onbekende stoffen.

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een bepaling, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden uitgevoerd. De betrouwbaarheid wordt bepaald door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid.

Chemische stof: een stof of een mengsel.

Conceptueel kader: het conceptueel kader van de OESO voor het testen en beoordelen van hormoonontregelende stoffen.

CV: variatiecoëfficiënt.

E2: 17β-oestradiol.

ER: oestrogeenreceptor.

hERα: humane oestrogeenreceptor-alfa.

Gevalideerde testmethode: een bepaling waarvoor valideringsstudies zijn gedaan om de relevantie (inclusief nauwkeurigheid) en betrouwbaarheid voor een bepaald doel te bepalen. Er moet worden opgemerkt dat een gevalideerde testmethode niet per definitie voldoende nauwkeurig en betrouwbaar is om aanvaardbaar te worden bevonden voor het voorgestelde doel (1).

Hormoonontregeling: de verstoring van de synthese, de opslag en het metabolisme van hormonen.

IC_{50}: de effectieve-concentratiemediaan van een remmende teststof.

ICCVAM: het Amerikaanse Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods.

Interlaboratoriumreproduceerbaarheid: een maatstaf voor de mate waarin verschillende gekwalificeerde laboratoria die gebruikmaken van hetzelfde protocol en die dezelfde stoffen testen, in kwalitatief en kwantitatief opzicht vergelijkbare resultaten kunnen produceren. De interlaboratoriumreproduceerbaarheid wordt bepaald tijdens de prevaliderings- en valideringsprocessen en geeft aan in hoeverre een bepaling met succes tussen laboratoria kan worden overgedragen; dit wordt ook wel reproduceerbaarheid tussen laboratoria genoemd (1).

Intralaboratoriumreproduceerbaarheid: een bepaling van de mate waarin gekwalificeerde mensen binnen hetzelfde laboratorium met succes resultaten kunnen repliceren met gebruikmaking

van een specifiek protocol op verschillende tijdstippen. Dit wordt ook "reproduceerbaarheid binnen laboratoria" genoemd (1).

LEC: de laagste effectieve concentratie is de laagste concentratie van de teststof die een respons opwekt (d.w.z. de laagste concentratie van de teststof waarbij de x-voudige inductie statistisch verschilt van de gelijktijdige vehiculumcontrole).

"Me too"-test: een informele uitdrukking voor een bepaling die in structureel en functioneel opzicht vergelijkbaar is met een gevalideerde en geaccepteerde testmethode. Dit is een alternatieve benaming voor gelijksoortige testmethode.

Nauwkeurigheid (concordantie): de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de bepaling en erkende referentiewaarden. Het is een maat voor de prestaties van de bepaling en één aspect van relevantie. Deze term en de term "concordantie", waaronder het percentage correcte uitkomsten van een bepaling wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt (1).

Oestrogene activiteit: het vermogen van een chemische stof om 17β-oestradiol na te bootsen voor wat betreft de mogelijkheid om aan oestrogeenreceptoren te binden. Met deze testmethode kan de binding aan de hERα worden gedetecteerd.

PBTG: op prestaties gebaseerde testrichtlijn.

Prestatienormen: normen, gebaseerd op een gevalideerde testmethode, die de basis vormen voor de beoordeling van de vergelijkbaarheid van een voorgestelde, in mechanistisch en functioneel opzicht gelijksoortige bepaling. Dit zijn 1) essentiële componenten van de bepaling; 2) een minimumlijst van referentiestoffen die zijn gekozen uit de stoffen die zijn gebruikt om de aanvaardbare prestaties van de gevalideerde testmethode aan te tonen; en 3) de vergelijkbare nauwkeurigheids- en betrouwbaarheidsniveaus die door de voorgestelde bepaling moeten worden gehaald wanneer ze worden beoordeeld aan de hand van de minimumlijst van referentiestoffen; deze waarden zijn gebaseerd op de waarden die voor de gevalideerde testmethode zijn verkregen (1).

RBA: relatieve bindingsaffiniteit. De RBA van een stof wordt berekend als een percentage van de log(IC_{50}) voor de stof ten opzichte van de log(IC_{50}) voor 17β-oestradiol.

Referentie-oestrogeen: 17ß-oestradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referentietestmethoden: de bepalingen waarop PBTG 493 gebaseerd is.

Regel van 10 %: optie om datapunten van de analyse uit te sluiten waarbij het gemiddelde percentage specifiek gebonden [^{3}H]17β-oestradiol van de duplo's 10 % of meer boven het gemiddelde van de waargenomen binding bij een lagere concentratie ligt (zie aanhangsel 4).

Relevantie: beschrijving van het verband van een bepaling met het te onderzoeken effect en of de bepaling betekenis heeft en nuttig is voor een bepaald doel. Het is de mate waarin de bepaling het te onderzoeken biologische effect correct meet of voorspelt. Relevantie omvat een beoordeling van de nauwkeurigheid (concordantie) van een bepaling (1).

SD: standaarddeviatie.

Stoffen voor bekwaamheidstoetsing: een subset van de referentiestoffen die in de prestatienormen zijn opgenomen. Laboratoria kunnen deze stoffen gebruiken om hun technische bekwaamheid met de gestandaardiseerde bepaling aan te tonen. Doorgaans zijn de selectiecriteria voor deze stoffen onder meer dat ze het hele spectrum van responsen bestrijken, dat ze in de handel verkrijgbaar zijn en dat er kwalitatief hoogwaardige referentiegegevens beschikbaar zijn.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

Validering: het proces om de betrouwbaarheid en de relevantie van een bepaald(e) benadering, methode, bepaling, proces of beoordeling voor een bepaald doel vast te stellen (1).

Aanhangsel 2

DE IN-VITROBEPALING VAN DE VERZADIGINGSBINDING EN COMPETITIEVE BINDING AAN DE OESTROGEENRECEPTOR (ERα) MET EEN VOLLEDIGE RECOMBINANTE ERα VAN FREYBERGER EN WILSON

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN (ZIE OOK ALGEMENE INLEIDING)

1. Bij deze in-vitrobepaling van de verzadigingsbinding en competitieve binding aan de oestrogeenreceptor (ERα) wordt gebruikgemaakt van een volledige menselijke ERα (hrERα) die wordt geproduceerd in en geïsoleerd uit met baculovirus geïnfecteerde insectencellen. Het protocol, dat werd ontwikkeld door Freyberger en Wilson, is aan een internationale valideringsstudie in meerdere laboratoria (2) onderworpen, die de relevantie en de betrouwbaarheid van het protocol voor het beoogde doel van de bepaling heeft aangetoond.

2. Deze bepaling is een screeningsprocedure voor het identificeren van stoffen die aan de volledige hrERα kunnen binden, en wordt gebruikt voor het bepalen van het vermogen van een teststof om met 17β-oestradiol te concurreren om binding aan de hrERα. De kwantitatieve resultaten van de bepaling kunnen onder meer de IC_{50} (een maat voor de concentratie waarbij een teststof de helft van het [^{3}H]-17β-oestradiol van de hrERα verdrijft) en de relatieve bindingsaffiniteiten van de teststoffen voor de hrERα ten opzichte van 17β-oestradiol omvatten. Ten behoeve van de screening van een chemische stof kunnen aanvaardbare kwalitatieve resultaten van de bepaling onder meer bestaan in de indeling van teststoffen als hrERα-binders, niet-binders, of onduidelijk op basis van criteria die zijn vastgesteld voor de bindingscurven.

3. Omdat voor de bepaling een radioactief gelabelde ligand wordt gebruikt, heeft het laboratorium een vergunning voor het werken met radioactieve stoffen nodig. Alle procedures met radio-isotopen en gevaarlijke chemische stoffen moeten voldoen aan de regelgeving en procedures zoals beschreven door nationale wetgeving.

4. Alvorens deze bepaling te gebruiken met het oog op regelgeving, moeten de "**ALGEMENE INLEIDING**" en "**COMPONENTEN VAN DE hrER-BINDINGSBEPALING**" worden geraadpleegd. De in deze TG gebruikte definities en afkortingen staan in aanhangsel 1.

BEGINSELEN VAN DE BEPALING (ZIE OOK DE ALGEMENE INLEIDING)

5. De bindingsbepaling met hrERα meet het vermogen van een radioactief gelabelde ligand ([^{3}H]17β-oestradiol) om aan de ER te binden in aanwezigheid van oplopende concentraties van een teststof (een "competitor"). Teststoffen met een hoge affiniteit voor de ER

concurreren in een lagere concentratie met de radioactief gelabelde ligand dan chemische stoffen met een lagere affiniteit voor de receptor.

6. Deze bepaling heeft twee hoofdcomponenten: een bepaling van de verzadigingsbinding om de parameters van de receptor-ligandinteractie te bepalen, gevolgd door een bepaling van de competitieve binding die de concurrentie tussen een teststof en een radioactief gelabelde ligand om binding aan de ER karakteriseert.

7. De bepaling van de verzadigingsbinding is bedoeld om de bindingsaffinititeit en het aantal receptoren in een bepaalde partij te bepalen, ter voorbereiding van de bepaling van de competitieve binding. Bij de bepaling van de verzadigingsbinding worden in een evenwichtstoestand de affiniteit van een vaste concentratie oestrogeenreceptoren voor hun natuurlijke ligand (uitgedrukt als de dissociatieconstante K_d) en de concentratie actieve receptorplaatsen (B_{max}) gemeten.

8. Bij de bepaling van de competitieve binding wordt de affiniteit van een stof om met [$_3$H]17β-oestradiol te concurreren om binding aan de ER gemeten. De affiniteit wordt gekwantificeerd door de concentratie waarbij de teststof, in een evenwichtstoestand, 50 % remming van de specifieke binding van [^{3}H]17β-oestradiol veroorzaakt (de zogenaamde "inhibitory concentration 50 %" of IC_{50}). Ze kan ook worden beoordeeld met behulp van de relatieve bindingsaffiniteit (RBA) ten opzichte van de IC_{50} van oestradiol, onafhankelijk gemeten in dezelfde testrun. Bij de bepaling van de competitieve binding wordt de binding van [$_3$H]17β-oestradiol in een vaste concentratie gemeten in aanwezigheid van een breed spectrum (acht orden van grootte) aan teststofconcentraties. De gegevens worden vervolgens, voor zover mogelijk, gefit tot een vorm van de Hill-vergelijking (Hill, 1910) die de verdringing van de radioactief gelabelde ligand door een competitieve binder voor één bindingsplaats beschrijft. De mate van verdringing van radioactief gelabeld oestradiol in evenwicht wordt gebruikt om de teststof te karakteriseren als een binder, een niet-binder of een stof met een onduidelijke respons.

PROCEDURE

Aantoning van aanvaardbare prestaties van het eiwit hrERα

9. Voorafgaand aan de routinematige uitvoering van de bepalingen van de verzadigingsbinding en de competitieve binding moet voor elke nieuwe partij hrERα worden aangetoond dat deze correct presteert in het laboratorium waar de partij zal worden gebruikt. Het proces om de prestaties aan te tonen bestaat uit de volgende twee stappen:

   - een bepaling van de verzadigingsbinding met [^{3}H]-17β-oestradiol om de specificiteit en de verzadiging voor hrERα aan te tonen. Met behulp van een niet-lineaire regressieanalyse van deze gegevens (bv. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) en de daaruit afgeleide Scatchard-plot worden de bindingsaffiniteit voor hrERα van [^{3}H]-17β-oestradiol (K_d) en het aantal receptoren (B_{max}) voor elke partij hrERα gedocumenteerd;

- een bepaling van de competitieve binding met de controlestoffen (het referentie-oestrogeen (17β-oestradiol), een zwakke binder (bv. noretynodrel of norethisteron), en een niet-binder (octyltriëthoxysilaan, OTES). Elk laboratorium moet een historische databank aanleggen om de consistentie van de IC_{50} en andere relevante waarden voor het referentie-oestrogeen en de zwakke binder tussen de experimenten en de verschillende partijen hrERα te documenteren. De parameters van de competitievebindingscurven voor de controlestoffen moeten binnen de grenzen van het 95 %-betrouwbaarheidsinterval (zie tabel 1) blijven, die werden vastgesteld op basis van gegevens van de laboratoria die aan de valideringsstudie voor deze bepaling hebben deelgenomen (2).

Tabel 1: Prestatiecriteria voor het referentie-oestrogeen en de zwakke binder in de FW-hrER-bindingsbepaling.

Stof	Parameter	Gemiddelde[a]	Standaarddeviatie (n)	95 %-Betrouwbaarheidsintervallen[b]	
				Ondergrens	Bovengrens
17β-Oestradiol	Top (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Basis (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hill-coëfficiënt	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	$LogIC_{50}$ (M)	-8,92[c]	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Noretynodrel	Top (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Basis (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hill-coëfficiënt	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	$LogIC_{50}$ (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Norethisteron[c]	Top (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Basis (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hill-coëfficiënt	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	$LogIC_{50}$ (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

[a] *Gemiddelde waarden (n) ± standaarddeviatie (SD) zijn berekend aan de hand van de geschatte curvefittingsparameters (Hill-vergelijking met vier parameters) voor de controletestruns die zijn uitgevoerd in vier laboratoria tijdens de valideringsstudie (zie bijlage N van referentie 2).*

[b] *Deze 95 %-betrouwbaarheidsintervallen zijn bedoeld ter oriëntatie voor aanvaardbaarheidscriteria.*

[c] *In de valideringsstudie was het testen van norethisteron optioneel voor Subtask 4 (zie referentie 2, Subtask 4). De gemiddelde waarden ± SD (n) werden daarom berekend aan de hand van de geschatte curvefittingsparameters (Hill-vergelijking met vier parameters) voor de controletestruns die werden uitgevoerd in twee laboratoria.*

Het IC_{50}-bereik zal afhangen van de Kd van het receptorpreparaat en de concentratie radioactief ligand die in elk laboratorium worden gebruikt. Het is aanvaardbaar om het IC_{50}-bereik aan te passen op basis van de omstandigheden bij de uitvoering van de bepaling.

Aantoning van de bekwaamheid van laboratoria

10. Zie de punten 17 en 18 en tabel 2 in **"COMPONENTEN VAN DE hrER-BINDINGSBEPALING"** van deze testmethode. Elke bepaling (verzadigingsbinding en competitieve binding) moet bestaan uit drie onafhankelijke testruns (d.w.z. met verse verdunningen van receptor, chemische stoffen en reagentia) op verschillende dagen, en elke testrun moet drie duplo's omvatten.

Bepaling van de concentratie van de receptor (hrERα)

11. De concentratie actieve receptoren varieert enigszins, afhankelijk van de partij en de bewaaromstandigheden. Daarom moet de concentratie actieve receptoren in de door de leverancier geleverde partij worden bepaald. Daarmee wordt de precieze concentratie actieve receptoren op het moment van de testrun verkregen.

12. Onder de omstandigheden van de bepaling van de competitieve binding (d.w.z. 1 nM [^{3}H]-oestradiol) worden nominale concentraties van 0,25, 0,5, 0,75 en 1 nM receptor

geïncubeerd in afwezigheid (totale binding) en aanwezigheid (niet-specifieke binding) van 1 µM ongelabeld oestradiol. De specifieke binding, berekend als het verschil tussen de totale en de niet-specifieke binding, wordt uitgezet tegen de nominale receptorconcentratie. Uit de receptorconcentratie waarbij de waarden voor de specifieke binding overeenkomen met 20 % van de toegevoegde radioactief gelabelde ligand kan de nominale receptorconcentratie worden afgeleid en deze moet worden gebruikt voor de bepalingen van de verzadigingsbinding en de competitieve binding. Vaak voldoet een hrER-eindconcentratie van 0,5 nM aan deze voorwaarde.

13. Als herhaaldelijk niet aan het 20 %-criterium kan worden voldaan, moet de proefopzet worden gecontroleerd op eventuele fouten. Dat het 20 %-criterium niet wordt gehaald, kan erop wijzen dat er zeer weinig actieve receptor in de recombinante partij aanwezig is. In dat geval moet worden overwogen een andere receptorpartij te gebruiken.

Verzadigingsbepaling

14. Er moeten acht oplopende concentraties [^{3}H]17β-oestradiol in drievoud worden beoordeeld onder de volgende drie omstandigheden (zie tabel 2):

- in afwezigheid van ongelabeld 17β-oestradiol en in aanwezigheid van ER. Dit is de bepaling van de totale binding door meting van de radioactiviteit in de putjes die alleen [^{3}H]17β-oestradiol bevatten;
- in aanwezigheid van een concentratie ongelabeld 17β-oestradiol die 1 000 maal hoger is dan die van gelabeld 17β-oestradiol en in aanwezigheid van ER. De bedoeling hiervan is om de actieve bindingssites te verzadigen met ongelabeld 17β-oestradiol en vervolgens door de radioactiviteit in de putjes te meten, de niet-specifieke binding te bepalen. Van al het resterende gelabelde ('heet') oestradiol dat aan de receptor kan binden, wordt aangenomen dat het aan een niet-specifieke bindingsplaats bindt, omdat het ongelabelde oestradiol ('koud') in een dermate hoge concentratie aanwezig is dat het alle beschikbare specifieke bindingsplaaten op de receptor inneemt;
- in afwezigheid van ongelabeld 17β-oestradiol en in afwezigheid van ER (bepaling van de totale radioactiviteit).

Bereiding van de oplossingen van [^{3}H]-17β-oestradiol en ongelabeld 17β-oestradiol

15. De verdunningen van [^{3}H]-17β-oestradiol moeten worden bereid door toevoeging van testbuffer aan een 12 nM stamoplossing van [^{3}H]-17β-oestradiol om zo concentraties te verkrijgen die in eerste instantie oplopen van 0,12 nM tot 12 nM. De uiteindelijke testconcentraties, oplopend van 0,03 tot 3,0 nM, worden verkregen door 40 µl van deze oplossingen toe te voegen aan de opeenvolgende testputjes van een microtiterplaat met 96 putjes (in een eindvolume van 160 µl). De bereiding van de testbuffer en van de stamoplossing en de verdunningen van [^{3}H]-17β-oestradiol en de bepaling van de concentraties worden uitvoerig beschreven in het protocol van de FW-bepaling, evenals de bepaling van de concentraties (2).

16. De verdunningen van 17β-oestradiol in ethanol moeten worden bereid door toevoeging van testbuffer om zo acht concentraties te verkrijgen die in eerste instantie oplopen van 0,06 µM tot 6 µM. De uiteindelijke testconcentraties, oplopend van 0,03 tot 3,0 µM, worden verkregen door 80 µl van deze oplossingen toe te voegen aan de opeenvolgende testputjes van een microtiterplaat met 96 putjes (in een eindvolume van 160 µl). De eindconcentraties ongelabeld 17β-oestradiol in elk testputje voor de bepaling van de niet-specifieke binding moeten 1 000 maal zo hoog zijn als de concentratie [^{3}H]-17β-oestradiol. De bereiding van de verdunningen van ongelabeld 17β-oestradiol wordt uitvoerig beschreven in het protocol van de FW-bepaling (2).

17. Voor de bepaling wordt de nominale receptorconcentratie gebruikt, waarmee een specifieke binding van 20 ± 5 % wordt verkregen (zie de punten 12-13). De hrERα-oplossing moet vlak voor gebruik worden bereid.

18. De 96-putjesplaten worden ingedeeld zoals weergegeven in tabel 2, met elke concentratie in drievoud. In aanhangsel 2.2 wordt een voorbeeld gegeven van de concentraties en volumes [^{3}H]-17β-oestradiol, ongelabeld 17β-oestradiol, buffer en receptor per testputje.

Tabel 2: Microtiterplaatindeling voor de bepaling van de verzadigingsbinding

	1	***2***	***3***	***4***	***5***	***6***	***7***	***8***	***9***	***10***	***11***	***12***	
A	0,03 nM [^{3}H]-E_2 + ER			0,06 nM [^{3}H]-E_2 + ER			0,08 nM [^{3}H]-E_2 + ER			0,10 nM [^{3}H]-E_2 + ER			Totale binding (oplosmid del)
B	0,30 nM [^{3}H]-E_2 + ER			0,60 nM [^{3}H]-E_2 + ER			1,0 nM [^{3}H]-E_2 + ER			3,0 nM [^{3}H]-E_2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H]-E_2 + ER + 0,03 µM E_2			0,06 nM [^{3}H]-E_2 + ER + 0,06 µM E_2			0,08 nM [^{3}H]-E_2 + ER + 0,08 µM E_2			0,10 nM [^{3}H]-E_2 + ER + 0,10 µM E_2			Niet-specifieke binding
E	0,30 nM [^{3}H]-E_2 + ER + 0,30 µM E_2			0,60 nM [^{3}H]-E_2 + ER + 0,60 µM E_2			1,0 nM [^{3}H]-E_2 + ER + 1,0 µM E_2			3,0 nM [^{3}H]-E_2 + ER + 3,0 µM E_2			
F													
G													
H													

[^{3}H]-E2: [^{3}H]-17β-oestradiol

ER: oestrogeenreceptor

E2: ongelabeld 17β-oestradiol

19. De testplaten moeten 16 tot 20 uur worden geïncubeerd bij 2 tot 8 °C en moeten gedurende de incubatieperiode op een schudder worden geplaatst.

Meting van aan de hrERα gebonden [^{3}H]-17β-oestradiol

20. Het aan de hrERα gebonden [^{3}H]-17β-oestradiol wordt gescheiden van het vrije [^{3}H]-17β-oestradiol door aan elk putje 80 µl koude DCC-suspensie toe te voegen, de microtiterplaten

10 minuten te schudden en vervolgens 10 minuten te centrifugeren bij ongeveer 2 500 rpm. Om te voorkomen dat tijdens dit proces het gebonden [^{3}H]-17β-oestradiol loskomt van de hrERα is het van cruciaal belang dat de buffers en de testputjes voortdurend op een temperatuur van 2 tot 8 °C worden gehouden en dat elke stap snel wordt uitgevoerd. Om de platen efficiënt en snel te kunnen verwerken is een schudder voor microtiterplaten nodig.

21. Vervolgens moet er uiterst voorzichtig, om verontreiniging van de putjes door aanraking van de DCC te vermijden, 50 µl van het supernatans met aan de hrERα gebonden [^{3}H]-17β-oestradiol worden overgebracht naar een tweede microtiterplaat.

22. Aan elk putje wordt dan 200 µl van een scintillatievloeistof toegevoegd die de kinetische energie van de kernemissies in lichtenergie kan omzetten (A1-B12 en D1 tot E12). De putjes G1-H12 (aangeduid als totaal in dpm) staan een reeks verdunningen van [^{3}H]-17β-oestradiol (40 µl) die direct moeten worden toegevoegd aan de scintillatievloeistof in de putjes van de meetplaat zoals aangegeven in tabel 3. Deze putjes bevatten dus alleen maar 200 µl scintillatievloeistof en de passende verdunning van [^{3}H]-17β-oestradiol. Deze metingen tonen aan hoeveel [^{3}H]-17β-oestradiol er, uitgedrukt in dpm, werd toegevoegd aan elke reeks putjes voor de totale binding en de niet-specifieke binding.

Tabel 3: Microtiterplaatindeling voor de bepaling van de verzadigingsbinding, meting van de radioactiviteit

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	
A	0,03 nM [^{3}H]-E_2 + ER			0,06 nM [^{3}H]-E_2 + ER			0,08 nM [^{3}H]-E_2 + ER			0,10 nM [^{3}H]-E_2 + ER			Totale binding (oplosmiddel)
B	0,30 nM [^{3}H]-E_2 + ER			0,60 nM [^{3}H]-E_2 + ER			1,0 nM [^{3}H]-E_2 + ER			3,0 nM [^{3}H]-E_2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H]-E_2 + ER + 0,03 µM E_2			0,06 nM [^{3}H]-E_2 + ER + 0,06 µM E_2			0,08 nM [^{3}H]-E_2 + ER + 0,08 µM E_2			0,10 nM [^{3}H]-E_2 + ER + 0,10 µM E_2			Niet-specifieke binding
E	0,30 nM [^{3}H]-E_2 + ER + 0,30 µM E_2			0,60 nM [^{3}H]-E_2 + ER + 0,60 µM E_2			1,0 nM [^{3}H]-E_2 + ER + 1,0 µM E_2			3,0 nM [^{3}H]-E_2 + ER + 3,0 µM E_2			
F													
G	0,03 nM [^{3}H]-E_2 (totaal in dpm)			0,06 nM [^{3}H]-E_2			0,08 nM [^{3}H]-E_2			0,10 nM [^{3}H]-E_2			Totaal in dpm*
H	0,30 nM [^{3}H]-E_2			0,60 nM [^{3}H]-E_2			1,0 nM [^{3}H]-E_2			3,0 nM [^{3}H]-E_2			

[^{3}H]-E2: [^{3}H]-17β-oestradiol

ER: oestrogeenreceptor

E2: ongelabeld 17β-oestradiol

dpm: desintegraties per minuut

*De seriële verdunningen van [^{3}H]-gelabeld ('heet') oestradiol hier moeten direct worden toegevoegd aan 200 µl scintillatievloeistof in de putjes G1 - H12.

23. Er moet ten minste 2 uur worden gewacht, alvorens met meten wordt begonnen, en de teltijd moet 40 minuten per putje bedragen. Het aantal desintegraties per minuut per putje (dpm/putje) wordt bepaald met behulp van een scintillatieteller voor microtiterplaten met dovingscorrectie. Als er geen scintillatieteller voor microtiterplaten beschikbaar is, kunnen de monsters ook met een conventionele teller worden gemeten. In dat geval moet worden overwogen de meettijd te verkorten.

Bepaling van de competitieve binding

24. Bij de bepaling van de competitieve binding wordt de binding van één concentratie [^{3}H]-17β-oestradiol in aanwezigheid van oplopende concentraties van de teststof gemeten. Binnen een testrun moeten er voor elke concentratie drie gelijktijdige duplobepalingen worden toegepast. Bovendien moeten er voor elke geteste chemische stof drie niet-gelijktijdige testruns worden uitgevoerd. Voor de bepaling moeten een of meer microtiterplaten met 96 putjes worden gebruikt.

Controles

25. Bij de uitvoering van de bepaling moeten in elk experiment gelijktijdig het oplosmiddel en controles (d.w.z. referentie-oestrogeen, zwakke binder en niet-binder) worden opgenomen. Tijdens elke testrun moeten volledige concentratiecurven voor het referentie-oestrogeen en de controles (d.w.z. zwakke binder en niet-binder) in één plaat worden gebruikt. Alle andere platen moeten i) een hoge (maximale verdrijving) en een middelhoge (bij benadering de IC_{50}) concentratie van zowel E2 als de zwakke binder in drievoud bevatten; en ii) oplosmiddelcontrole en niet-specifieke binding, elk ten minste in drievoud. De procedures voor de bereiding van de testbuffer, controles en [^{3}H]-17β-oestradiol-, hrERα- en teststofoplossingen worden beschreven in referentie 2 (bijlage K, zie protocol FW-bepaling).

Oplosmiddelcontrole:

26. De oplosmiddelcontrole bevestigt dat er geen interactie optreedt tussen het oplosmiddel en het testsysteem en meet bovendien de totale binding (TB). Als oplosmiddel wordt bij voorkeur ethanol gebruikt. Als de hoogste concentratie teststof niet in ethanol oplosbaar is, mag ook DMSO worden gebruikt. De concentratie ethanol of DMSO, indien gebruikt, is in de putjes aan het eind van de bepaling 1,5 % en mag niet hoger zijn dan 2 %.

Buffercontrole:

27. De buffercontrole (BC) mag geen oplosmiddel of teststof bevatten, maar wel alle andere componenten van de bepaling. De resultaten van de buffercontrole worden vergeleken met de oplosmiddelcontrole om te verifiëren dat het oplosmiddel het testsysteem niet beïnvloedt.

Sterke binder (referentie-oestrogeen)

28. 17β-oestradiol (CAS 50-28-2) is de endogene ligand en bindt met hoge affiniteit aan de oestrogeenreceptor, alfa-subtype. Voor elke bepaling van de competitieve binding aan de hrERα moet een standaardcurve worden gemaakt met behulp van ongelabeld 17β-oestradiol, om de variabiliteit bij gebruik van de bepaling in de loop van de tijd in hetzelfde laboratorium te kunnen beoordelen. Er moeten acht oplossingen van ongelabeld 17β-oestradiol in ethanol worden bereid, waarbij de concentraties in de testputjes afnemen van 100 nM tot 10 pM (-7[logM] tot -11[logM]), met de volgende verdeling: (-7[logM], -8[logM], -8,5[logM], -9[logM], -9,5[logM], -10[logM], -11[logM]). De hoogste concentratie ongelabeld 17β-oestradiol (1 µM) dient ook als indicator voor niet-specifieke binding. Deze concentratie wordt in tabel 4 aangeduid met het label "NSB", maar is ook onderdeel van de standaardcurve.

Zwakke binder

29. In de test moet een zwakke binder (noretynodrel (CAS RN 68-23-5) of norethisteron (CAS RN 68-22-4)) worden opgenomen om van elk experiment de gevoeligheid aan te tonen en om de variabiliteit te kunnen beoordelen bij gebruik van de bepaling in de loop van de tijd. Er moeten acht oplossingen van de zwakke binder in ethanol worden bereid, waarbij de concentraties in de testputjes oplopen van 3 nM tot 30 µM (-8,5[logM] tot -4,5[logM]), met de volgende verdeling: (-4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6.5[logM], -7[logM], -7,5[logM], -8,5[logM]).

Niet-binder

30. Als negatieve controle (niet-binder) moet octyltriëthoxysilaan (OTES, CAS RN 2943-75-1) worden gebruikt. Hiermee wordt geverifieerd of de bepaling, zoals ze wordt uitgevoerd, teststoffen wel detecteert als ze niet aan de hrERα binden. Er moeten acht oplossingen van de niet-binder in ethanol worden bereid, waarbij de concentraties in de testputjes in logaritmische stappen oplopen van 0,1 nM tot 1 000 µM (-10[logM] tot -3[logM]). Als alternatief kan ook di-*n*-butylftalaat (DBP) als niet-binder worden gebruikt. De maximale oplosbaarheid daarvan is vastgesteld op -4[logM].

hrERα-concentratie

31. Voor de bepaling wordt de hoeveelheid receptoren gebruikt waarmee een specifieke binding van 20 ± 5 % aan 1 nM radioligand wordt verkregen (zie de punten 12-13 van aanhangsel 2). De hrERα-oplossing moet vlak voor gebruik worden bereid.

[^{3}H]-17β-oestradiol

32. De concentratie [^{3}H]-17β-oestradiol in de testputjes moet 1,0 nM bedragen.

Teststoffen

33. Vooraf moet voor elke stof een oplosbaarheidstest worden verricht om de oplosbaarheidsgrens vast te stellen en om het passende concentratiebereik te bepalen dat bij de uitvoering van het testprotocol moet worden aangehouden. De oplosbaarheidsgrens van elke teststof wordt eerst bepaald in het oplosmiddel en nader bevestigd onder de

omstandigheden van de bepaling. De uiteindelijk in de bepaling te testen concentratie mag niet hoger zijn dan 1 mM. De bereikbepalingstest bestaat uit een oplosmiddelcontrole samen met een logaritmische reeks van acht verdunningen, beginnend bij de maximaal aanvaardbare concentratie (bv. 1 mM of lager, afhankelijk van de oplosbaarheidsgrens), waarbij de aanwezigheid van troebelheid of neerslag moet worden opgemerkt (zie ook punt 35). De teststof moet worden getest met de acht curven van de logaritmische reeks van concentraties uit de voorafgaande bereikbepalingstest. In het tweede en het derde experiment moeten de concentraties voor zover nodig worden aangepast om de concentratie-responscurve beter te kunnen karakteriseren.

34. De verdunningen van de teststof moeten worden bereid in het geschikte oplosmiddel (zie punt 26 van aanhangsel 2). Als de hoogste concentratie van de teststof niet oplosbaar is in ethanol of DMSO en de toevoeging van meer oplosmiddel ertoe zou leiden dat de oplosmiddelconcentratie in het putje aan het eind van de bepaling boven de maximaal aanvaardbare concentratie komt, mag de op een na hoogste concentratie als hoogste concentratie worden genomen. In dat geval kan aan de onderkant van de concentratiereeks een aanvullende concentratie worden toegevoegd. De andere concentraties in de reeks moeten onveranderd blijven.

35. Als de teststofoplossingen aan de testputjes worden toegevoegd, moet goed worden opgelet of er geen neerslag ontstaat. Bij het fitten van de curven moeten de gegevens voor alle putjes met neerslag worden uitgesloten en moet de reden voor deze uitsluiting worden vermeld.

36. Als er gegevens uit andere bronnen voorhanden zijn waaraan een log(IC_{50}) van een teststof kan worden ontleend, kan het zinvol zijn om de verdunningen geometrisch rond die waarde te spreiden, bv. met 0,5 logeenheden rond de verwachte log(IC_{50}). De uiteindelijke resultaten moeten een concentratiebereik aan weerszijden van log(IC_{50}) omvatten, inclusief de "top" en de "basis", dat breed genoeg is om de bindingscurve naar behoren te kunnen karakteriseren.

Testplaatindeling

37. Er moeten gemarkeerde microtiterplaten worden voorbereid voor zes van codes voorziene incubatieduplo's voor de oplosmiddelcontrole, de hoogste concentratie van het referentie-oestrogeen, die ook als indicator voor niet-specifieke binding (NSB) dient, en de buffercontrole en voor drie van codes voorziene incubatieduplo's voor alle acht concentraties van de niet-bindende controle (octyltriëthoxysilaan), de zeven lagere concentraties van het referentie-oestrogeen, de acht concentraties/dosisniveaus van de zwakke binder en de acht concentraties van elke teststof (test chemical, TC) In tabel 4 wordt een voorbeeld gegeven van een plaatindelingsdiagram voor de volledige concentratiecurven van het referentie-oestrogeen en de controles. Voor de teststoffen worden aanvullende microtiterplaten gebruikt. Deze moeten ook de volgende plaatcontroles bevatten: i) een hoge (maximale verdrijving) en een middelhoge (bij benadering de IC_{50})

concentratie van zowel E2 als de zwakke binder in drievoud; ii) oplosmiddelcontrole en niet-specifieke binding, elk in zesvoud (tabel 5). In aanhangsel 2.3 is een voorbeeld opgenomen van een werkblad met de microtiterplaatindeling voor een competitieve bepaling met drie onbekende teststoffen. De in de tabellen 4 en 5 aangegeven concentraties zijn de eindconcentraties van de bepaling. De maximale concentratie E2 moet 1×10^{-7} M bedragen en voor de zwakke binder moet de hoogste concentratie van de zwakke binder in plaat 1 worden gebruikt. De IC_{50}-concentratie moet door het laboratorium worden bepaald op basis van zijn historische controledatabank. Naar verwachting zal deze waarde ongeveer gelijk zijn aan de waarde die in de valideringsstudies werd waargenomen (zie tabel 1).

Tabel 4: Microtiterplaatindeling voor de bepaling van de competitieve binding, volledige concentatiecurven voor het referentie-oestrogeen en de controles (plaat 1).

	1	***2***	***3***	***4***	***5***	***6***	***7***	***8***	***9***	***10***	***11***	***12***
A	TB (alleen oplosmiddel)			TB (alleen oplosmiddel)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1 \times 10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Blanco*		
D	NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1 \times 10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1 \times 10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1 \times 10^{-7,5}$)			NE ($1 \times 10^{-8,5}$)		
F	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
G	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
H	Blanco (voor 'heet')**			Blanco (voor 'heet')**			Buffercontrole			Buffercontrole		

In dit voorbeeld is de zwakke binder noretynodrel (NE)

*een echte blanco, putje wordt niet gebruikt

**blanco wordt niet gebruikt tijdens de incubatie, maar wel ter bevestiging van de totaal toegevoegde radioactiviteit.

Tabel 5: Microtiterplaatindeling voor de bepaling van de competitieve binding, volledige concentatiecurven voor de teststoffen en plaatcontroles.

	1	***2***	***3***	***4***	***5***	***6***	***7***	***8***	***9***	***10***	***11***	***12***
A	TB (alleen oplosmiddel)			TB (alleen oplosmiddel)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
C	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
D	TC2 (1×10^{-3})			TC2 (1×10^{-4})			TC2 (1×10^{-5})			TC2 (1×10^{-6})		
E	TC2 (1×10^{-7})			TC2 (1×10^{-8})			TC2 (1×10^{-9})			TC2 (1×10^{-10})		
F	TC3 (1×10^{-3})			TC3 (1×10^{-4})			TC3 (1×10^{-5})			TC3 (1×10^{-6})		
G	TC3 (1×10^{-7})			TC3 (1×10^{-8})			TC3 (1×10^{-9})			TC3 (1×10^{-10})		
H	NE (IC_{50})			NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10^{-7})		

In dit voorbeeld is de zwakke binder noretynodrel (NE)

Afronding van de bepaling van de competitieve binding

38. Zoals in tabel 6 weergegeven moet er 80 µl van de oplosmiddelcontrole, de buffercontrole, het referentie-oestrogeen, de zwakke binder, de niet-binder en de in testbuffer bereide teststoffen aan de putjes worden toegevoegd. Vervolgens wordt er aan elk putje 40 µl van een 4 nM [^{3}H]-17β-oestradioloplossing toegevoegd. Na 10 à 15 minuten voorzichtig roteren bij een temperatuur van 2 tot 8 °C wordt er 40 µl hrERα-oplossing toegevoegd. De testplaten moeten 16 tot 20 uur worden geïncubeerd bij 2 tot 8 °C en moeten gedurende de incubatieperiode op een schudder worden geplaatst.

Tabel 6: Het volume van de testcomponenten voor de bepaling van de competitieve binding aan de hrER, microtiterplaten

Volume (µl)	Bestanddeel
80	Ongelabeld 17β-oestradiol, noretynodrel, OTES, teststoffen, oplosmiddel of buffer
40	4 nM [^{3}H]-17β-oestradioloplossing
40	hrERα-oplossing, in de vooraf bepaalde concentratie
160	***Totaal volume in elk testputje***

39. Nadat het aan de hrERα gebonden [^{3}H]-17β-oestradiol door de toevoeging aan elk putje van 80 µl koude DCC-suspensie is gescheiden van het vrije [^{3}H]-17β-oestradiol, moet het aan de hrERα gebonden [^{3}H]-17β-oestradiol worden gekwantificeerd zoals beschreven in de punten 20-23 voor de bepaling van de verzadigingsbepaling.

40. De putjes H1-6 (in tabel 4 aangeduid als blanco's (voor 'heet')) vertegenwoordigen de desintegraties per minuut (dpm) van het [^{3}H]-oestradiol in 40 µl. Het aliquot van 40 µl moet in de putjes H1 - H6 direct aan de scintillatievloeistof worden toegevoegd.

Aanvaardbaarheidscriteria

Bepaling van de verzadigingsbinding

41. Naarmate de gebruikte concentratie [$_3$H]-17β-oestradiol oploopt, moet de curve voor de specifieke binding een plateau bereiken, waaruit blijkt dat de hrERα verzadigd raakt met ligand.

42. De specifieke binding bij 1 nM [^{3}H]-17β-oestradiol moet binnen het aanvaardbare bereik van 15 % tot 25 % van het gemiddelde van de in totaal gemeten radioactiviteit over alle testruns blijven. Incidentele, lichte afwijkingen buiten dit bereik zijn aanvaardbaar, maar als testruns structureel buiten dit bereik uitkomen of als voor een bepaalde testrun de

specifieke binding ver erbuiten ligt, moet de eiwitconcentratie worden aangepast en moet de bepaling van de verzadigingsbinding worden herhaald.

43. De gegevens moeten een lineaire Scatchard-plot opleveren.

44. Er mag niet te veel niet-specifieke binding optreden. In het algemeen moet de waarde voor de niet-specifieke binding < 35 % van de totale binding zijn. Incidenteel mag de verhouding deze grens evenwel overschrijden bij het meten van zeer lage aantallen dpm voor de laagst geteste concentratie radioactief gelabeld 17β-oestradiol.

Bepaling van de competitieve binding

45. Naarmate de concentratie ongelabeld 17β-oestradiol oploopt, moet het [^{3}H]-17β-oestradiol van de receptor verdrijven op een manier die past bij competitieve binding op één bindingsplaats.

46. De IC_{50}-waarde voor het referentie-oestrogeen (d.w.z. 17β-oestradiol) moet ongeveer gelijk zijn aan de molaire concentratie [^{3}H]-17β-oestradiol plus de K_d zoals bepaald in de bepaling van de verzadigingsbinding.

47. De totale specifieke binding moet steeds binnen het aanvaardbare bereik van 20 ± 5 % blijven, wanneer het gemiddelde van de gemeten concentratie van de totale radioactiviteit die aan elk putje is toegevoegd, voor alle testruns 1 nM is. Incidentele, lichte afwijkingen buiten dit bereik zijn aanvaardbaar, maar als testruns structureel buiten dit bereik uitkomen of als voor een bepaalde testrun de specifieke binding ver erbuiten ligt, moet de eiwitconcentratie worden aangepast.

48. Het oplosmiddel mag geen invloed hebben op de gevoeligheid en reproduceerbaarheid van de bepaling. De resultaten van de oplosmiddelcontrole (TB-putjes) worden vergeleken met de buffercontrole om te verifiëren dat het oplosmiddel het testsysteem niet beïnvloedt. Als het oplosmiddel geen invloed heeft op de bepaling, moeten de resultaten van de oplosmiddel- en de buffercontrole vergelijkbaar zijn.

49. De niet-binder mag niet meer dan 25 % van het [^{3}H]-17β-oestradiol van de hrERα verdrijven, wanneer wordt getest tot 10^{-3} M (OTES) of 10^{-4} M (DBP).

50. De prestatiecriteria voor het referentie-oestrogeen en de twee zwakke binders (bv. noretynodrel of norethisteron) zijn tot stand gekomen op basis van gegevens uit de valideringsstudie van de FW-hrER-bindingsbepaling (bijlage N van referentie 2). De 95 %-betrouwbaarheidsintervallen komen voort uit de gemiddelden (n) ± SD van alle controletestruns in alle laboratoria die aan de valideringsstudie hebben deelgenomen. Er zijn 95 %-betrouwbaarheidsintervallen berekend voor de curvefittingsparameters (d.w.z. top, basis, Hill-coëfficiënt, log(IC_{50})) van het referentie-oestrogeen en de zwakke binders en voor de $\log_{10}$RBA van de zwakke binders ten opzichte van het referentie-oestrogeen. Deze worden gegeven als prestatiecriteria voor de positieve controles. In tabel 1 zijn de

verwachte bereiken voor de curvefittingsparameters weergegeven, die als prestatiecriteria kunnen worden gebruikt. In de praktijk kan het bereik van de IC_{50} licht variëren afhankelijk van de K_d van het receptorpreparaat en de ligandconcentratie.

51. Voor de curvefittingsparameters voor de teststoffen zijn geen prestatiecriteria opgesteld vanwege het brede spectrum aan bestaande potentiële teststoffen en de varia in potentiële affiniteiten en uitslagen (bv. volledig gefitte, gedeeltelijk gefitte of geen gefitte curve). De resultaten van elke testrun voor een teststof moeten evenwel worden geëvalueerd op basis van professioneel oordeel. Er moet een voldoende breed bereik van concentraties van de teststof worden gebruikt om de top van de competitieve curve (bv. 90-100 % binding) duidelijk te kunnen bepalen. De variabiliteit tussen de duplo's van elke teststofconcentratie en tussen de drie gelijktijdige testruns moet binnen redelijke grenzen blijven en wetenschappelijk verdedigbaar zijn. De controles van elke testrun voor een teststof moeten de voor deze FW-bepaling gerapporteerde prestatiemetingen benaderen en consistent zijn met de historische controlegegevens van elk betreffende laboratorium.

ANALYSE VAN DE GEGEVENS

Bepaling van de verzadigingsbinding

52. Zowel de totale als de niet-specifieke binding wordt gemeten. Op basis van deze waarden wordt de specifieke binding van oplopende concentraties [^{3}H]-17β-oestradiol in evenwichtstoestand berekend door de niet-specifieke binding van de totale binding af te trekken. Wanneer de specifieke binding wordt uitgezet tegen de concentratie [^{3}H]-17β-oestradiol moet de grafiek een plateau bereiken voor de maximale specifieke binding, die overeenkomt met de verzadiging van de hrERα met het [^{3}H]-17β-oestradiol. Bovendien moet een analyse van de gegevens blijk geven van de binding van het [^{3}H]-17β-oestradiol aan één bindingsplaats met een hoge affiniteit. De curve voor de verzadigingsbinding moet de niet-specifieke, totale en specifieke binding weergeven. Voor de verdere analyse van deze gegevens moet een niet-lineaire regressieanalyse worden gebruikt (bv. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995), waarna de gegevens worden gepresenteerd in de vorm van een Scatchard-plot.

53. Bij de analyse van de gegevens moeten B_{max} en K_d worden bepaald op basis van alleen de gegevens voor de totale binding, waarbij wordt aangenomen dat de niet-specifieke binding lineair is, tenzij het gebruik van een andere methode wordt onderbouwd. Bovendien moet voor het bepalen van de beste fit robuuste regressie worden toegepast, tenzij een rechtvaardiging wordt gegeven voor een afwijkende keuze. De robuuste-regressiemethode moet worden vermeld. Bij het bepalen van B_{max} en K_d uit gegevens voor de verzadigingsbinding moet altijd worden gecorrigeerd voor liganddepletie (bv. met behulp van de methode van Swillens, 1995).

Bepaling van de competitieve binding

54. De competitievebindingscurve wordt uitgezet als de specifieke binding van [^{3}H]-17β-oestradiol tegen de concentratie (log10-eenheden) van de competitor. De concentratie waarbij de teststof de maximale specifieke binding van [^{3}H]-17β-oestradiol voor 50 % remt, is de IC_{50}-waarde.

55. De log(IC_{50})-waarden voor de positieve controles (bv. het referentie-oestrogeen en de zwakke binder) moeten worden geschat met behulp van software voor niet-lineaire fitting van de curve die geschikt is voor het fitten van een Hill-vergelijking met vier parameters (bv. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Bij het fitten van de curven moeten de top, basis, Hill-coëfficiënt, en log(IC_{50}) over het algemeen onbegrensd blijven. Voor het bepalen van de beste fit moet robuuste regressie worden toegepast, tenzij een rechtvaardiging wordt gegeven voor een afwijkende keuze. Er moet niet worden gecorrigeerd voor liganddepletie. Na de eerste analyse moet voor elke bindingscurve worden geverifieerd op een goede fit ten opzichte van het model. De relatieve bindingsaffiniteit (RBA) voor de zwakke binder moet worden berekend als een percentage van de log(IC_{50}) voor de zwakke binder ten opzichte van de log(IC_{50}) voor 17β-oestradiol. De resultaten van de positieve controles en de controle met de niet-binder moeten worden beoordeeld aan de hand van de maatstaven voor de prestaties van de bepaling in de punten 45-50 van aanhangsel 2.

56. De gegevens voor alle teststoffen moeten worden geanalyseerd volgens een trapsgewijze benadering, zodat de gegevens correct worden beoordeeld en elke competitievebindingscurve correct wordt ingedeeld. Aanbevolen wordt om elke testrun voor een teststof eerst te onderwerpen aan een gestandaardiseerde gegevensanalyse die identiek is aan de gegevensanalyse die werd gebruikt voor het referentie-oestrogeen en de zwakkebindercontroles (zie punt 55 hierboven). Zodra deze is afgerond, moet een technische beoordeling van de curvefittingsparameters worden verricht, alsmede een visuele inspectie van de mate waarin de gegevens overeenkomen met de gegenereerde competitievebindingscurve voor elke testrun. Bij deze technische beoordeling zijn een waargenomen concentratie-afhankelijke afname van het percentage specifiek gebonden [^{3}H]-17β-oestradiol, een geringe variabiliteit tussen de technische duplo's van elke teststofconcentratie en de consistentie in de fittingsparameters tussen de drie testruns een goede indicatie dat de bepaling en de gegevensanalyses correct zijn uitgevoerd.

Gegevensinterpretatie

57. Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt een teststof als binder voor de hrERα beschouwd als er een bindingscurve kan worden gefit en het laagste punt op de responscurve binnen het bereik van de gegevens overeenkomt met minder dan 50 % binding (figuur 1).

58. Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt een teststof als niet-binder voor de hrERα beschouwd als:

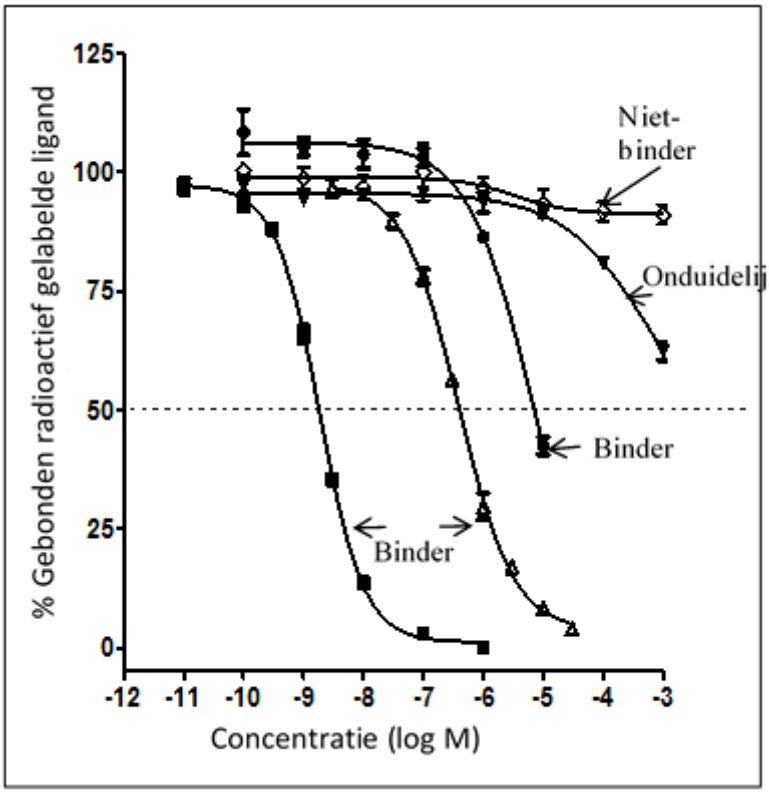
- er een bindingscurve gefit kan worden en het laagste punt op de gefitte responscurve binnen het bereik van de gegevens overeenkomt met meer dan 75 % binding; of
- er geen bindingscurve kan worden gefit en het laagste, niet-afgevlakte gemiddelde bindingspercentage van alle concentratiegroepen binnen de gegevens overeenkomt met meer dan 75 % binding.

59. Als aan geen van de bovenstaande voorwaarden wordt voldaan (bv. als het laagste punt op de gefitte responscurve overeenkomt met 76 tot 51 % binding) wordt de teststof als 'onduidelijk' beschouwd.

Tabel 7: Criteria voor de indeling van een teststof op basis van de competitievebindingscurve.

Indeling	**Criterium**
Binder[a]	Er kan een curve worden gefit. **Het laagste punt op de responscurve binnen het bereik van de gegevens komt overeen met minder dan 50 % binding.**
Niet-binder[b]	Als er een curve kan worden gefit, **komt het laagste punt op de gefitte responscurve binnen het bereik van de gegevens overeen met meer dan 75 % binding.** Als er geen curve kan worden gefit, **komt het laagste, niet-afgevlakte gemiddelde bindingspercentage van alle concentratiegroepen binnen de gegevens overeen met meer dan 75 % binding.**
Onduidelijk[c]	Een beoordeelbare testrun die noch als binder, noch als niet-binder kan worden ingedeeld (bv. het laagste punt op de gefitte responscurve komt overeen met 76 tot 51 % binding).

Figuur 1: Voorbeelden van de indeling van een teststof met behulp van een competitievebindingscurve.



60. De verschillende testruns die binnen een laboratorium voor een teststof zijn uitgevoerd, worden gecombineerd door aan elke testrun numerieke waarden toe te kennen en het gemiddelde van deze waarden te nemen, zoals weergegeven in tabel 8. De resultaten van de gecombineerde testruns binnen elk laboratorium worden vergeleken met de verwachte indeling voor elke teststof.

Tabel 8: Methode voor de indeling van een teststof op basis van meerdere testruns binnen hetzelfde laboratorium

Toekenning van een waarde aan elke testrun:	
Indeling	**Numerieke waarde**
Binder	2
Onduidelijk	1
Niet-binder	0
Indeling op basis van het gemiddelde van de numerieke waarden van de testruns:	
Indeling	**Numerieke waarde**
Binder	Gemiddelde ≥ 1,5
Onduidelijk	0,5 ≤ Gemiddelde < 1,5
Niet-binder	Gemiddelde < 0,5

TESTVERSLAG

61. Zie punt 24 van "**COMPONENTEN VAN DE hrER-BINDINGSBEPALING**" van deze testmethode.

Aanhangsel 2.1

TERMENLIJST

[^{3}H]E2: met radioactief tritium gelabeld 17β-oestradiol.

DCC: met dextraan beklede kool.

Duplo: een van de meerdere putjes in één testrun die dezelfde inhoud in dezelfde concentraties bevatten en die gelijktijdig worden getest. In dit protocol wordt elke concentratie van de teststof in drievoud getest; dat wil zeggen bij elke concentratie van de teststof worden er drie duplo's gelijktijdig getest.

E2: ongelabeld 17β-oestradiol (inert).

hrERα: menselijke recombinante oestrogeenreceptor alfa (ligandbindingsdomein).

Testbuffer: 10 mM tris, 10 mg runderserumalbumine/ml, 2 mM DTT, 10 % glycerol, 0,2 mM leupeptine, pH 7,5.

Testrun: een volledige set van gelijktijdig gerunde testputjes van een microtiterplaat die alle benodigde gegevens oplevert voor het bepalen van de binding van een teststof aan de hrERα, namelijk de totale hoeveelheid aan het testputje toegevoegd [^{3}H]-17β-oestradiol, de maximale binding van [^{3}H]-17β-oestradiol aan de hrERα, de niet-specifieke binding en de totale binding bij verschillende teststofconcentraties). Een testrun zou uit slechts één testputje per concentratie kunnen bestaan, maar aangezien dit protocol testen in drievoud voorschrijft, bestaat een testrun uit drie testputjes per concentratie. Bovendien schrijft dit protocol drie onafhankelijke (d.w.z. niet-gelijktijdige) testruns per chemische stof voor.

Aanhangsel 2.2

VOORBEELD VAN EEN BEPALING VAN DE VERZADIGING MET [^{3}H]-17B-OESTRADIOL IN DRIEVOUD

Voorbeeld van een bepaling van de verzadiging met [^{3}H]-17β-oestradiol in drievoud											
Positie	**Duplo**	**Code voor type putje**	**Beginconcentratie 'heet' E2 (nM)**	**Volume 'heet' E2 (µl)**	**Eindconcentratie 'heet' E2 (nM)**	**Beginconcentratie 'koud' E2 (µM)**	**Volume 'koud' E2 (µl)**	**Eindconcentratie 'koud' E2 (µM)**	**Volume buffer (µl)**	**Volume receptor (µl)**	**Totaal volume in putjes**
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160

Voorbeeld van een bepaling van de verzadiging met [^{3}H]-17β-oestradiol in drievoud

Positie	Duplo	Code voor type putje	Beginconcentratie 'heet' E2 (nM)	Volume 'heet' E2 (µl)	Eindconcentratie 'heet' E2 (nM)	Beginconcentratie 'koud' E2 (µM)	Volume 'koud' E2 (µl)	Eindconcentratie 'koud' E2 (µM)	Volume buffer (µl)	Volume receptor (µl)	Totaal volume in putjes
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Heet	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Heet	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Heet	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Heet	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Heet	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Heet	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Heet	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Heet	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Heet	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Heet	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Heet	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Heet	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Heet	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Heet	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Heet	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Heet	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	Heet	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Heet	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Heet	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Heet	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Heet	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Heet	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Heet	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Heet	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Er zij op gewezen dat de 'hot' (heet) putjes tijdens de incubatie leeg zijn. De 40 µl wordt alleen toegevoegd voor de scintillatietelling.

Aanhangsel 2.3: Plaatindeling voor de bepaling van de competitieve binding

Plaat	Positie	Duplo	Type putje	Code putje	Code concentratie	Beginconcentratie competitor (M)	hER-stamoplossing (µl)	Volume buffer (µl)	Volume tracer ('hete' E2) (µl)	Volume verdunningsplaat (µl)	Eindvolume (µl)	Eindconcentratie competitor (M)
S	A1	1	totale binding	TB	TB1	-	40		40	80	160	-
S	A2	2	totale binding	TB	TB2	-	40		40	80	160	-
S	A3	3	totale binding	TB	TB3	-	40		40	80	160	-
S	A4	1	totale binding	TB	TB4	-	40		40	80	160	-
S	A5	2	totale binding	TB	TB5	-	40		40	80	160	-
S	A6	3	totale binding	TB	TB6	-	40		40	80	160	-
S	A7	1	'koud' E2 (hoog)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	'koud' E2 (hoog)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	'koud' E2 (hoog)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	'koud' E2 (hoog)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	'koud' E2 (hoog)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	'koud' E2 (hoog)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	'koud' E2	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	'koud' E2	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	'koud' E2	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	'koud' E2	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B5	2	'koud' E2	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	'koud' E2	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	'koud' E2	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	'koud' E2	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	'koud' E2	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B10	1	'koud' E2	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	'koud' E2	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	'koud' E2	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	'koud' E2	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	'koud' E2	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	'koud' E2	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	'koud' E2	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	'koud' E2	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	'koud' E2	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	'koud' E2	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	'koud' E2	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C9	3	'koud' E2	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	blanco	blanco	B1	-	-	160	-	-	160	-
S	C11	2	blanco	blanco	B2	-	-	160	-	-	160	-
S	C12	3	blanco	blanco	B3	-	-	160	-	-	160	-
S	D1	1	noretynodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	noretynodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	noretynodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	noretynodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	noretynodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	noretynodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D7	1	noretynodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	noretynodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	noretynodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	noretynodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	noretynodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	noretynodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06

Plaatindeling voor de bepaling van de competitieve binding

Plaat	Positie	Duplo	Type putje	Code putje	Code concentratie	Beginconcentratie competitor (M)	hrER-stamoplossing (µl)	Volume buffer (µl)	Volume tracer ('hete' E2) (µl)	Volume verdunningsplaat (µl)	Eindvolume (µl)	Eindconcentratie competitor (M)
S	E1	1	noretynodrel	NE	WP	6,00E-07-	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	noretynodrel	NE	WP	6,00E-07-	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	noretynodrel	NE	WP	6,00E-07-	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	noretynodrel	NE	WP	2,00E-07-	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	noretynodrel	NE	WP	2,00E-07-	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	noretynodrel	NE	WP	2,00E-07-	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	noretynodrel	NE	WP	6,00E-08-	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E8	2	noretynodrel	NE	WP	6,00E-08-	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	noretynodrel	NE	WP	6,00E-08-	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	noretynodrel	NE	WP	6,00E-09-	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	E11	2	noretynodrel	NE	WP	6,00E-09-	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	noretynodrel	NE	WP	6,00E-09-	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	-	40	80	160	1,0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	-	40	80	160	1,0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	-	40	80	160	1,0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	-	40	80	160	1,0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	-	40	80	160	1,0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	-	40	80	160	1,0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	-	40	80	160	3,0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	-	40	80	160	3,0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	-	40	80	160	3,0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	G6	3	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	G8	2	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	-	40	-	160	1,0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	-	40	-	160	1,0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	-	40	-	160	1,0E-10
S	H1	1	heet	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H2	1	heet	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H3	1	heet	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H4	1	heet	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H5	1	heet	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H6	1	heet	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H7	1	buffercontrole	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H8	1	buffercontrole	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H9	1	buffercontrole	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H10	1	buffercontrole	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H11	1	buffercontrole	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H12	1	buffercontrole	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-

Er zij op gewezen dat de 'hot' (heet) putjes tijdens de incubatie leeg zijn. De 40 µl wordt alleen toegevoegd voor de scintillatietelling.

Plaatindeling voor de bepaling van de competitieve binding

Plaat	Positie	Duplo	Type putje	Code putje	Code concentratie	Beginconcentratie competitor (M)	hrER-stamoplossing (µl)	Volume buffer (µl)	Volume tracer ('hete' E2) (µl)	Volume verdunningsplaat (...)	Eindvolume (µl)	Eindconcentratie competitor (M)
P1	A1	1	totale binding	TB	TBB1B1	-	40	-	40	80	160	-
P1	A2	2	totale binding	TB	TB2	-	40	-	40	80	160	-
P1	A3	3	totale binding	TB	TB3	-	40	-	40	80	160	-
P1	A4	1	totale binding	TB	TB4	-	40	-	40	80	160	-
P1	A5	2	totale binding	TB	TB5	-	40	-	40	80	160	-
P1	A6	3	totale binding	TB	TB6	-	40	-	40	80	160	-
P1	A7	1	'koud' E2 (hoog)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	'koud' E2 (hoog)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	'koud' E2 (hoog)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	'koud' E2 (hoog)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	'koud' E2 (hoog)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A12	3	'koud' E2 (hoog)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	Teststof 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	Teststof 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	Teststof 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	Teststof 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	Teststof 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	Teststof 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	Teststof 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	Teststof 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	Teststof 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	Teststof 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	Teststof 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	Teststof 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	C1	1	Teststof 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	Teststof 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	Teststof 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	Teststof 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	Teststof 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	Teststof 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	Teststof 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	Teststof 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	Teststof 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	Teststof 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	Teststof 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	Teststof 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	Teststof 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	Teststof 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	Teststof 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	Teststof 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	Teststof 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	Teststof 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	Teststof 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	Teststof 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	Teststof 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	Teststof 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	Teststof 2	TC2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	Teststof 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	E1	1	Teststof 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	Teststof 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	Teststof 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07

Plaatindeling voor de bepaling van de competitieve binding

Plaat	Positie	Duplo	Type putje	Code putje	Code concentratie	Beginconcentratie competitor (M)	hrER-stamoplossing (µl)	Volume buffer (µl)	Volume tracer ('hete' E2) (µl)	Volume verdunningsplaat (µl)	Eindvolume (µl)	Eindconcentratie competitor (M)
P1	E4	1	Teststof 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	Teststof 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	Teststof 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	Teststof 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	Teststof 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	Teststof 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	Teststof 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	Teststof 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	Teststof 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	Teststof 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	Teststof 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	Teststof 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	Teststof 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	Teststof 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	Teststof 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	Teststof 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	Teststof 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	Teststof 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	Teststof 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	Teststof 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	Teststof 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	G1	1	Teststof 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	Teststof 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	Teststof 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	Teststof 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	Teststof 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	Teststof 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	Teststof 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	Teststof 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	Teststof 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	Teststof 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	Teststof 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	Teststof 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	noretynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretynodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretynodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretynodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	'koud' E2 S			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	'koud' E2 S			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	'koud' E2 S			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	'koud' E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	'koud' E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	'koud' E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	

Aanhangsel 3

DE IN-VITROBEPALING VAN DE BINDING AAN DE OESTROGEENRECEPTOR MET EEN MENSELIJK RECOMBINANT ERA-LIGANDBINDINGSDOMEIN-EIWIT VAN HET JAPANSE CHEMICALS EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE (CERI-BEPALING)

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN (ZIE OOK ALGEMENE INLEIDING)

1. Bij deze in-vitrobepaling van de verzadigingsbinding en competitieve binding aan de oestrogeenreceptor (ERα) wordt gebruikgemaakt van een ligandbindingsdomein (LBD) van de menselijke ERα (hrERα). Dit eiwitpreparaat is geproduceerd door het Japanse Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI), Japan, en bestaat in de vorm van een fusie-eiwit met glutathion-S-transferase (GST), tot expressie gebracht in *E. coli.* Het CERI-protocol is aan een internationale valideringsstudie in meerdere laboratoria (2) onderworpen, die de relevantie en de betrouwbaarheid van het protocol voor het beoogde doel van de bepaling heeft aangetoond.

2. Deze bepaling is een screeningsprocedure voor het identificeren van stoffen die aan de hrERα kunnen binden, en wordt gebruikt voor het bepalen van het vermogen van een teststof om met 17β-oestradiol te concurreren om binding aan de hrERα-LBD. De kwantitatieve resultaten van de bepaling kunnen onder meer de IC_{50} (een maat voor de concentratie waarbij een teststof de helft van het [^{3}H]-17β-oestradiol van de hrERα verdrijft) en de relatieve bindingsaffiniteiten van de teststoffen voor de hrERα ten opzichte van 17β-oestradiol omvatten. Ten behoeve van de screening van een chemische stof kunnen aanvaardbare kwalitatieve resultaten van de bepaling onder meer bestaan in de indeling van teststoffen als hrERα-binders, niet-binders, of onduidelijk op basis van criteria die zijn vastgesteld voor de bindingscurven.

3. Omdat voor de bepaling een radioactief gelabelde ligand wordt gebruikt, heeft het laboratorium een vergunning voor het werken met radioactieve stoffen nodig. Alle procedures met radio-isotopen en gevaarlijke chemische stoffen moeten voldoen aan de regelgeving en procedures zoals beschreven door nationale wetgeving.

4. Alvorens deze bepaling te gebruiken met het oog op regelgeving, moeten de "**ALGEMENE INLEIDING**" en "**COMPONENTEN VAN DE hrER-BINDINGSBEPALING**" worden geraadpleegd. De in deze TG gebruikte definities en afkortingen staan in aanhangsel 1.

BEGINSELEN VAN DE BEPALING (ZIE OOK DE ALGEMENE INLEIDING)

5. De bindingsbepaling met hrERα meet het vermogen van een radioactief gelabelde ligand ([^{3}H]17β-oestradiol) om aan de ER te binden in aanwezigheid van oplopende concentraties van een teststof (een "competitor"). Teststoffen met een hoge affiniteit voor de ER

concurreren in een lagere concentratie met de radioactief gelabelde ligand dan chemische stoffen met een lagere affiniteit voor de receptor.

6. Deze bepaling heeft twee hoofdcomponenten: een bepaling van de verzadigingsbinding om de parameters van de receptor-ligandinteractie te bepalen, gevolgd door een bepaling van de competitieve binding die de concurrentie tussen een teststof en een radioactief gelabelde ligand om binding aan de ER karakteriseert.

7. De bepaling van de verzadigingsbinding is bedoeld om de bindingsaffinititeit en het aantal receptoren in een bepaalde partij te bepalen, ter voorbereiding van de bepaling van de competitieve binding. Bij de bepaling van de verzadigingsbinding worden in een evenwichtstoestand de affiniteit van een vaste concentratie oestrogeenreceptoren voor hun natuurlijke ligand (uitgedrukt als de dissociatieconstante K_d) en de concentratie actieve receptorplaatsen (B_{max}) gemeten.

8. Bij de bepaling van de competitieve binding wordt de affiniteit van een stof om met [$_3$H]17β-oestradiol te concurreren om binding aan de ER gemeten. De affiniteit wordt gekwantificeerd door de concentratie waarbij de teststof, in een evenwichtstoestand, 50 % remming van de specifieke binding van [^{3}H]17β-oestradiol veroorzaakt (de zogenaamde "inhibitory concentration 50 %" of IC_{50}). Ze kan ook worden beoordeeld met behulp van de relatieve bindingsaffiniteit (RBA) ten opzichte van de IC_{50} van oestradiol, onafhankelijk gemeten in dezelfde testrun. Bij de bepaling van de competitieve binding wordt de binding van [$_3$H]17β-oestradiol in een vaste concentratie gemeten in aanwezigheid van een breed spectrum (acht orden van grootte) aan teststofconcentraties. De gegevens worden vervolgens, voor zover mogelijk, gefit tot een vorm van de Hill-vergelijking (Hill, 1910) die de verdringing van de radioactief gelabelde ligand door een competitieve binder voor één bindingsplaats beschrijft. De mate van verdringing van radioactief gelabeld oestradiol in evenwicht wordt gebruikt om de teststof te karakteriseren als een binder, een niet-binder of een stof met een onduidelijke respons.

PROCEDURE

Aantoning van aanvaardbare prestaties van het eiwit hrERα

9. Voorafgaand aan de routinematige uitvoering van de bepalingen van de verzadigingsbinding en de competitieve binding moet voor elke nieuwe partij hrERα worden aangetoond dat deze correct presteert in het laboratorium waar de partij zal worden gebruikt. Het proces om de prestaties aan te tonen bestaat uit de volgende twee stappen:

   - een bepaling van de verzadigingsbinding met [^{3}H]-17β-oestradiol om de specificiteit en de verzadiging voor hrERα aan te tonen. Met behulp van een niet-lineaire regressieanalyse van deze gegevens (bv. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) en de daaruit afgeleide Scatchard-plot worden de bindingsaffiniteit voor hrERα van [^{3}H]-17β-oestradiol (K_d) en het aantal receptoren (B_{max}) voor een bepaalde partij hrERα gedocumenteerd;

- een bepaling van de competitieve binding met de controlestoffen (het referentie-oestrogeen (17β-oestradiol), een zwakke binder (bv. noretynodrel of norethisteron), en een niet-binder (octyltriëthoxysilaan, OTES). Elk laboratorium moet een historische databank aanleggen om de consistentie van de IC_{50} en de relevante waarden voor het referentie-oestrogeen en de zwakke binder tussen de experimenten en de verschillende partijen hrERα te documenteren. Bovendien moeten de parameters van de competitievebindingscurven voor de controlestoffen binnen de grenzen van het 95 %-betrouwbaarheidsinterval (zie tabel 1) blijven, die werden vastgesteld op basis van gegevens van de laboratoria die aan de valideringsstudie voor deze bepaling hebben deelgenomen (2).

Tabel 1: Prestatiecriteria voor het referentie-oestrogeen en de zwakke binder in de CERI-hrER-bindingsbepaling.

Stof	Parameter	Gemiddelde [a]	Standaarddeviatie (n)	95 %-Betrouwbaarheidsintervallen[b]	
				Ondergrens	Bovengrens
17β-Oestradiol	Top	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Basis	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Hill-coëfficiënt	-1,22	0,20 (70)	-1,27	-1,17
	$LogIC_{50}$	-8,93	0,23 (70)	-8,98	-8,87
Noretynodrel	Top	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Basis	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hill-coëfficiënt	-1,04	0,21 (68)	-1,09	-0,99
	$LogIC_{50}$	-6,19	0,40 (68)	-6,29	-6,10
Norethisteron[c]	Top	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Basis	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hill-coëfficiënt	-1,18	0,32 (23)	-1,31	-1,04
	$LogIC_{50}$	-6,01	0,54 (23)	-6,25	-5,78

[a] Gemiddelde waarden ± standaarddeviatie (SD) met steekproefgrootte (n) zijn berekend aan de hand van de geschatte curvefit (Hill-vergelijking met vier parameters) voor de controletestruns die zijn uitgevoerd in vier laboratoria tijdens de valideringsstudie (zie bijlage N van referentie 2).

[b] Deze 95 %-betrouwbaarheidsintervallen zijn bedoeld ter oriëntatie voor aanvaardbaarheidscriteria.

[c] In de valideringsstudie was het testen van norethisteron optioneel voor Subtask 4 (zie referentie 2, Subtask 4). De gemiddelde waarden ± SD (n) werden daarom berekend aan de hand van de geschatte curvefittingsparameters (Hill-vergelijking met vier parameters) voor de controletestruns die werden uitgevoerd in twee laboratoria.

Het IC_{50}-bereik zal afhangen van de K_d van het receptorpreparaat en de concentratie radioactief ligand die in elk laboratorium worden gebruikt. Het is aanvaardbaar om het IC_{50}-bereik aan te passen op basis van de omstandigheden bij de uitvoering van de bepaling.

Aantoning van de bekwaamheid van laboratoria

10. Zie de punten 17 en 18 en tabel 2 in "**COMPONENTEN VAN DE hrER-BINDINGSBEPALING**" van deze testmethode. Elke bepaling (verzadigingsbinding en competitieve binding) moet bestaan uit drie onafhankelijke testruns (d.w.z. met verse verdunningen van receptor, chemische stoffen en reagentia) op verschillende dagen, en elke testrun moet drie duplo's omvatten.

Bepaling van de concentratie van de receptor (hrER*α*)

11. De concentratie actieve receptoren varieert enigszins, afhankelijk van de partij en de bewaaromstandigheden. Daarom moet de concentratie actieve receptoren in de door de leverancier geleverde partij worden bepaald. Daarmee wordt de precieze concentratie actieve receptoren op het moment van de testrun verkregen.

12. Onder de omstandigheden van de bepaling van de competitieve binding (d.w.z. 0,5 nM [^{3}H]-oestradiol) worden nominale concentraties van 0,1, 0,2, 0,4 en 0,6 nM receptor

geïncubeerd in afwezigheid (totale binding) en aanwezigheid (niet-specifieke binding) van 1 µM ongelabeld oestradiol. De specifieke binding, berekend als het verschil tussen de totale en de niet-specifieke binding, wordt uitgezet tegen de nominale receptorconcentratie. Uit de receptorconcentratie waarbij de waarden voor de specifieke binding overeenkomen met 40 % van de toegevoegde radioactief gelabelde ligand kan de receptorconcentratie worden afgeleid en deze moet worden gebruikt voor de bepalingen van de verzadigingsbinding en de competitieve binding. Vaak voldoet een hrER-eindconcentratie van 0,2 nM aan deze voorwaarde.

13. Als herhaaldelijk niet aan het 40 %-criterium kan worden voldaan, moet de proefopzet worden gecontroleerd op eventuele fouten. Dat het 40 %-criterium niet wordt gehaald, kan erop wijzen dat er zeer weinig actieve receptor in de recombinante partij aanwezig is. In dat geval moet worden overwogen een andere receptorpartij te gebruiken.

Verzadigingsbepaling

14. Er moeten acht oplopende concentraties [^{3}H]17β-oestradiol in drievoud worden beoordeeld onder de volgende drie omstandigheden (zie tabel 2):

    a. in afwezigheid van ongelabeld 17β-oestradiol en in aanwezigheid van ER. Dit is de bepaling van de totale binding door meting van de radioactiviteit in de putjes die alleen [^{3}H]17β-oestradiol bevatten;

    b. in aanwezigheid van een concentratie ongelabeld 17β-oestradiol die 2 000 maal hoger is dan die van gelabeld 17β-oestradiol en in aanwezigheid van ER. De bedoeling hiervan is om de actieve bindingssites te verzadigen met ongelabeld 17β-oestradiol en vervolgens door de radioactiviteit in de putjes te meten, de niet-specifieke binding te bepalen. Van al het resterende gelabelde ('heet') oestradiol dat aan de receptor kan binden, wordt aangenomen dat het aan een niet-specifieke bindingsplaats bindt, omdat het ongelabelde oestradiol ('koud') in een dermate hoge concentratie aanwezig is dat het alle beschikbare specifieke bindingsplaaten op de receptor inneemt;

    c. in afwezigheid van ongelabeld 17β-oestradiol en in afwezigheid van ER (bepaling van de totale radioactiviteit).

Bereiding van de oplossingen van [^{3}H]-17β-oestradiol, ongelabeld 17β-oestradiol en hrERα

15. Op basis van een stamoplossing van 1 µM [^{3}H]-17β-oestradiol in DMSO moet een oplossing van 40 nM [^{3}H]-17β-oestradiol worden bereid door toevoeging van DMSO (tot een concentratie van 200 nM) en vervolgens testbuffer bij kamertemperatuur (tot een concentratie van 40 nM). Deze oplossing van 40 nM wordt gebruikt om de [^{3}H]-17β-oestradiol-verdunningsreeks van 0,313 nM tot 40 nM te bereiden door toevoeging van testbuffer bij kamertemperatuur (zoals weergegeven in kolom 12 van tabel 2). De uiteindelijke testconcentraties, oplopend van 0,0313 tot 4,0 nM, worden verkregen door 10 µl van deze oplossingen toe te voegen aan de opeenvolgende testputjes van een

microtiterplaat met 96 putjes (zie tabellen 2 en 3). De bereiding van de testbuffer, de berekening van de initiële stamoplossing van [^{3}H]-17β-oestradiol op basis van de specifieke activiteit, de bereiding van de verdunningen en de bepaling van de concentraties worden uitvoerig beschreven in het protocol van de CERI-bepaling (2).

16. De verdunningen van ongelabeld 17β-oestradiol moeten worden bereid door toevoeging van testbuffer aan een stamoplossing van 1 nM 17β-oestradiol om zo acht concentraties te verkrijgen die in eerste instantie oplopen van 0,625 µM tot 80 µM. De uiteindelijke testconcentraties, oplopend van 0,0625 tot 8 µM, worden verkregen door 10 µl van deze oplossingen toe te voegen aan de opeenvolgende testputjes van een microtiterplaat met 96 putjes voor de meting van de niet-specifieke binding (zie tabellen 2 en 3). De bereiding van de verdunningen van ongelabeld 17β-oestradiol wordt uitvoerig beschreven in het protocol van de CERI-bepaling (2).

17. Voor de bepaling wordt de receptorconcentratie gebruikt, waarmee een specifieke binding van 40 ± 10 % wordt verkregen (zie de punten 12-13). De hrERα-oplossing moet vlak voor gebruik worden bereid, d.w.z. nadat de putjes voor totale binding, niet-specifieke binding en 'hete' ligand afzonderlijk al zijn bereid. Hierbij moet ijskoude testbuffer worden gebruikt.

18. De 96-putjesplaten worden ingedeeld zoals weergegeven in tabel 2, met elke concentratie van [^{3}H]-17β-oestradiol in drievoud. De volumes [^{3}H]-17β-oestradiol, ongelabeld 17β-oestradiol, buffer en receptor zijn weergegeven in tabel 3.

Tabel 2: Microtiterplaatindeling voor de bepaling van de verzadigingsbinding

	1*	**2***	**3***	**4***	**5***	**6***	**7***	**8***	**9***	**10**	**11****	**12****
	Voor meting van de TB			Voor meting van de NSB			Voor meting van de 'hete' ligand afzonderlijk				Verdunningen van ongelabeld E2 voor kolommen 4-	Verdunningen van [^{3}H]-E2 voor kolommen 1-9 van de plaat
A	0,0313 nM [^{3}H]-E2 + ER			0,0313 nM [^{3}H]-E2 + 0,0625 µM E2 + ER			0,0313 nM				0,625 µM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3}H]-E2 + ER			0,0625 nM [^{3}H]-E2 + 0,125 µM E2 + ER			0,0625 nM				1,25 µM	0,625 nM
C	30,125 nM [^{3}H]-E2 + ER			0,125 nM [^{3}H]-E2 + 0,25 µM E2 + ER			0,125 nM				2,5 µM	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3}H]-E2 + ER			0,250 nM [^{3}H]-E2 + 0,5 µM E2 + ER			0,250 nM				5 µM	2,5 nM
E	0,50 nM [^{3}H]-E2 + ER			0,50 nM [^{3}H]-E2 + 1 µM E2 + ER			0,50 nM				10 µM	5 nM

F	1,00 nM [^{3}H]-E2 + ER	1,00 nM [^{3}H]-E2 + 2 µM E2 + ER	1,00 nM		20 µM	10 nM
G	2,00 nM [^{3}H]-E2 + ER	2,00 nM [^{3}H]-E2 + 4 µM E2 + ER	2,00 nM		40 µM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H]-E2 + ER	4,00 nM [^{3}H]-E2 + 8 µM E2 + ER	4,00 nM		80 µM	40 nM

TB: totale binding

NSB: niet-specifieke binding

[^{3}H]-E2: [^{3}H]-17β-oestradiol

E2: ongelabeld 17β-oestradiol

*De hier vermelde concentraties zijn de eindconcentraties in elk putje.

**De verdunningen van het ongelabelde E2 en het [^{3}H]-E2 mogen in verschillende platen worden bereid.

Tabel 3: Reagensvolumes voor de microtiterplaat voor de verzadigingsbepaling

Kolomnummer		***1***	***2***	***3***	***4***	***5***	***6***	***7****	***8****	***9****
Voorbereidende stappen		***TB-putjes***			***NSB-putjes***			***'Hete' ligand***		
Volume componenten voor betreffende reactieputjes en volgorde toevoeging	Buffer	60 µl			50 µl			90 µl		
	ongelabelde E2 uit tabel 2, kolom 11	-			10 µl			-		
	[^{3}H]-E2 uit tabel 2, kolom 12	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			-		
Totaal reactievolume		100 µl			100 µl			100 µl		
Incubatie		**NA 2 UUR REACTIE TIJDENS INCUBATIE**						Kwantificering van de radioactiviteit vlak na bereiding. Geen incubatie		
Behandeling met 0,4 % DCC		**Ja**			**Ja**			**Nr.**		
Volume 0,4 % DCC		100 µl			100 µl			-		
Filtratie		Ja			Ja			Nr.		
METING DPM										
Kwantificering aan het scintillatiemengsel toegevoegd volume		100 µl**			100 µl**			50 µl		

*Als voor het bepalen van het aantal dpm een vloeistofscintillatieteller voor microtiterplaten wordt gebruikt, kan de 'hete' ligand afzonderlijk niet in dezelfde plaat worden bereid als de TB- en NSB-putjes. De 'hete' ligand afzonderlijk moet in dat geval in een andere plaat worden bereid.

**Als de DCC wordt gescheiden door middel van centrifugatie, moet voor de vloeistofscintillatietelling 50 µl van het supernatans worden gebruikt om verontreiniging met de DCC te vermijden.

19. De microtiterplaten voor de bepaling van de totale binding en de niet-specifieke binding moeten twee uur worden geïncubeerd bij kamertemperatuur (22 °C to 28 °C).

Meting van aan de hrERα gebonden [^{3}H]-17β-oestradiol

20. Na twee uur incuberen moet het aan de hrERα gebonden [^{3}H]-17β-oestradiol worden gescheiden van het vrije [^{3}H]-17β-oestradiol door 100 µl van een ijskoude 0,4 % DCC-suspensie aan de putjes toe te voegen. Vervolgens moeten de platen 10 minuten op ijs worden geplaatst, waarna het reactiemengsel en de DCC-suspensie moeten worden gefilterd met behulp van een filter voor microtiterplaten om de DCC te verwijderen. 100 µl van het filtraat moet worden toegevoegd aan scintillatievloeistof in scintillatieflesjes om het aantal desintegraties per minuut (dpm) per flesje te meten door middel van vloeistofscintillatietelling.

21. Als er geen filter voor microtiterplaten beschikbaar is, kan de DCC door middel van centrifugatie worden verwijderd. Vervolgens moet er uiterst voorzichtig, om verontreiniging van de putjes door aanraking van de DCC te vermijden, 50 µl van het supernatans met aan de hrERα gebonden [^{3}H]-17β-oestradiol worden genomen en voor de scintillatietelling worden gebruikt.

22. De meting van de 'hete' ligand afzonderlijk wordt gebruikt om het aantal desintegraties per minuut (dpm) van het aan de testputjes toegevoegde [^{3}H]-17β-oestradiol te bepalen. De radioactiviteit moet direct na de bereiding worden gemeten. Deze putjes moeten worden niet geïncubeerd of met DCC-suspensie behandeld; de inhoud ervan moet rechtstreeks in de scintillatievloeistof worden overgebracht. Deze metingen tonen aan hoeveel [^{3}H]-17β-oestradiol er, uitgedrukt in dpm, werd toegevoegd aan elke reeks putjes voor de totale binding en de niet-specifieke binding.

Bepaling van de competitieve binding

23. Bij de bepaling van de competitieve binding wordt de binding van één concentratie [^{3}H]-17β-oestradiol in aanwezigheid van oplopende concentraties van de teststof gemeten. Binnen een testrun moeten er voor elke concentratie drie gelijktijdige duplobepalingen worden toegepast. Bovendien moeten er voor elke geteste chemische stof drie niet-gelijktijdige testruns worden uitgevoerd. Voor de bepaling moeten een of meer microtiterplaten met 96 putjes worden gebruikt.

Controles

24. Bij de uitvoering van de bepaling moeten in elk experiment gelijktijdig het oplosmiddel en controles (d.w.z. referentie-oestrogeen, zwakke binder en niet-binder) worden opgenomen. Tijdens elke testrun moeten volledige concentratiecurven voor het referentie-oestrogeen en de controles (d.w.z. zwakke binder en niet-binder) in één plaat worden gebruikt. Alle andere platen moeten i) een hoge (maximale verdrijving, d.w.z. nagenoeg volledige verdrijving van de radioactief gelabelde ligand) en een middelhoge (bij benadering de IC_{50}) concentratie van E2 en de zwakke binder in drievoud bevatten; en ii) oplosmiddelcontrole en niet-specifieke binding, elk in drievoud. De procedures voor de bereiding van de

testbuffer en de [^{3}H]-17β-oestradiol-, hrERα- en teststofoplossingen worden uitvoerig beschreven in het protocol van de CERI-bepaling (2).

Oplosmiddelcontrole:

25. De oplosmiddelcontrole bevestigt dat er geen interactie optreedt tussen het oplosmiddel en het testsysteem en meet bovendien de totale binding (TB). Als oplosmiddel wordt bij voorkeur DMSO gebruikt. Als de hoogste concentratie teststof niet in DMSO oplosbaar is, mag ook ethanol worden gebruikt. De uiteindelijke DMSO-concentratie in de testputjes moet 2,05 % zijn en mag, als de teststof onvoldoende oplost, worden verhoogd tot maximaal 2,5 %. DMSO-concentraties van meer dan 2,5 % mogen niet worden gebruikt, omdat hogere oplosmiddelconcentraties de bepaling verstoren. Voor teststoffen die niet oplosbaar zijn in DMSO, maar wel in ethanol, kan maximaal 2 % ethanol worden gebruikt zonder dat dit de bepaling verstoort.

Buffercontrole:

26. De buffercontrole (BC) mag geen oplosmiddel of teststof bevatten, maar wel alle andere componenten van de bepaling. De resultaten van de buffercontrole worden vergeleken met de oplosmiddelcontrole om te verifiëren dat het oplosmiddel het testsysteem niet beïnvloedt.

Sterke binder (referentie-oestrogeen)

27. 17β-oestradiol (CAS 50-28-2) is de endogene ligand en bindt met hoge affiniteit aan de oestrogeenreceptor, alfa-subtype. Voor elke bepaling van de competitieve binding aan de hrERα moet een standaardcurve worden gemaakt met behulp van ongelabeld 17β-oestradiol, om de variabiliteit bij gebruik van de bepaling in de loop van de tijd in hetzelfde laboratorium te kunnen beoordelen. Er moeten acht concentraties ongelabeld 17β-oestradiol in DMSO en testbuffer worden bereid, waarbij de eindconcentraties in de testputjes voor de standaardcurve als volgt zijn gespreid: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. De hoogste concentratie ongelabeld 17β-oestradiol (1 µM) dient als indicator voor niet-specifieke binding. Deze concentratie wordt in tabel 4 aangeduid met het label "NSB", maar is ook onderdeel van de standaardcurve.

Zwakke binder

28. In de test moet een zwakke binder (noretynodrel (CAS RN 68-23-5), of als alternatief norethisteron (CAS RN 68-22-4)) worden opgenomen om van elk experiment de gevoeligheid aan te tonen en om de variabiliteit te kunnen beoordelen bij gebruik van de bepaling in de loop van de tijd. Er moeten acht concentraties zwakke binder in DMSO en testbuffer worden bereid, waarbij de eindconcentraties in de testputjes als volgt zijn gespreid: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} en 10^{-9} M.

Niet-binder

29. Als negatieve controle (niet-binder) moet octyltriëthoxysilaan (OTES, CAS RN 2943-75-1) worden gebruikt. Hiermee wordt geverifieerd of de bepaling, zoals ze wordt uitgevoerd,

teststoffen die niet aan de hrERα binden, wel detecteert. Er moeten acht concentraties niet-binder in DMSO en testbuffer worden bereid, waarbij de eindconcentraties in de testputjes als volgt zijn gespreid: 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Als alternatief kan ook di-*n*-butylftalaat (DBP, CAS 84-72-2) als niet-binder worden gebruikt, maar slechts tot 10^{-4} M. De maximale oplosbaarheid van DBP in de bepaling is vastgesteld op 10^{-4} M.

hrERα-concentratie

30. Voor de bepaling wordt de hoeveelheid receptoren gebruikt waarmee een specifieke binding van 40 ± 10 % wordt verkregen (zie de punten 12-13 van aanhangsel 3). De hrERα-oplossing moet vlak voor gebruik worden bereid door verdunning van de functionele hrERα in ijskoude testbuffer.

[^{3}H]-17β-oestradiol

31. De eindconcentratie [^{3}H]-17β-oestradiol in de testputjes moet 0,5 nM bedragen.

Teststoffen

32. Vooraf moet voor elke stof een oplosbaarheidstest worden verricht om de oplosbaarheidsgrens vast te stellen en om het passende concentratiebereik te bepalen dat bij de uitvoering van het testprotocol moet worden aangehouden. De oplosbaarheidsgrens van elke teststof wordt eerst bepaald in het oplosmiddel en nader bevestigd onder de omstandigheden van de bepaling. De uiteindelijk in de bepaling te testen concentratie mag niet hoger zijn dan 1 mM. De bereikbepalingstest bestaat uit een oplosmiddelcontrole samen met een logaritmische reeks van acht verdunningen, beginnend bij de maximaal aanvaardbare concentratie (bv. 1 mM of lager, afhankelijk van de oplosbaarheidsgrens), waarbij de aanwezigheid van troebelheid of neerslag moet worden opgemerkt (zie ook punt 35 van aanhangsel 3). Wanneer het concentratiebereik voor de bepaling is bepaald, moet de teststof worden getest in een logaritmische reeks van 8 concentraties met passende intervallen zoals vastgesteld in de voorafgaande bereikbepalingstest. De in het tweede en het derde experiment geteste concentraties moeten voor zover nodig verder worden aangepast om de concentratie-responscurve beter te kunnen karakteriseren.

33. De verdunningen van de teststof moeten worden bereid in het geschikte oplosmiddel (zie punt 25 van aanhangsel 3). Als de hoogste concentratie van de teststof niet oplosbaar is in DMSO of ethanol en de toevoeging van meer oplosmiddel ertoe zou leiden dat de oplosmiddelconcentratie in het putje aan het eind van de bepaling boven de maximaal aanvaardbare concentratie komt, mag de op een na hoogste concentratie als hoogste concentratie worden genomen. In dat geval kan aan de onderkant van de concentratiereeks een aanvullende concentratie worden toegevoegd. De andere concentraties in de reeks moeten onveranderd blijven.

34. Als de teststofoplossingen aan de testputjes worden toegevoegd, moet goed worden opgelet of er geen neerslag ontstaat. Bij het fitten van de curven moeten de gegevens voor alle putjes met neerslag worden uitgesloten en moet de reden voor deze uitsluiting worden vermeld.

35. Als er gegevens uit andere bronnen voorhanden zijn waaraan een log(IC_{50}) van een teststof kan worden ontleend, kan het zinvol zijn om de verdunningen geometrisch dichter rond de verwachte log(IC_{50}) te spreiden, (bv. met 0,5 logeenheden). De uiteindelijke resultaten moeten een voldoende breed concentratiebereik aan weerszijden van log(IC_{50}) bestrijken, inclusief de "top" en de "basis", dat breed genoeg is om de bindingscurve naar behoren te kunnen karakteriseren.

Testplaatindeling

36. Er moeten gemarkeerde microtiterplaten worden voorbereid met incubaties in zesvoud voor de oplosmiddelcontrole, de hoogste concentratie van het referentie-oestrogeen (E2), die ook als indicator voor niet-specifieke binding (NSB) dient, de buffercontrole, de acht concentraties van de niet-bindende controle (octyltriëthoxysilaan), de zeven lagere concentraties van het referentie-oestrogeen (E2), de acht concentraties van de zwakke binder (noretynodrel of norethisteron) en de acht concentraties van elke teststof (TC). In tabel 4 wordt een voorbeeld gegeven van een plaatindelingsdiagram voor de volledige concentratiecurven van het referentie-oestrogeen en de controles. Voor de teststof worden aanvullende microtiterplaten gebruikt. Deze moeten ook de volgende plaatcontroles bevatten: i) een hoge (maximale verdrijving) en een middelhoge (bij benadering de IC_{50}) concentratie van E2 en de zwakke binder in drievoud; ii) oplosmiddelcontrole (als totale binding) en niet-specifieke binding, elk in zesvoud (tabel 5). In aanhangsel 3.3 is een voorbeeld opgenomen van een werkblad met de microtiterplaatindeling voor een competitieve bepaling met drie onbekende teststoffen. De in het werkblad en in de tabellen 4 en 5 aangegeven concentraties verwijzen naar de eindconcentraties in elk testputje. De maximale concentratie E2 moet 1×10^{-7} M bedragen en voor de zwakke binder moet de hoogste concentratie van de zwakke binder in plaat 1 worden gebruikt. De IC_{50}-concentratie moet door het laboratorium worden bepaald op basis van zijn historische controledatabank. Verwacht wordt dat deze waarde ongeveer gelijk zal zijn aan de waarde die in de valideringsstudies werd waargenomen (zie tabel 1).

Tabel 4: Microtiterplaatindeling voor de bepaling van de competitieve binding[1,2], volledige concentatiecurven voor het referentie-oestrogeen en de controles (plaat 1)

	1	***2***	***3***	***4***	***5***	***6***	***7***	***8***	***9***	***10***	***11***	***12***
	Buffercontrole en positieve controle (E2)			**Zwakke positieve controle (noretynodrel)**			**Negatieve controle (OTES)**			**TB en NSB**		
A	Blanco*			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (oplosmiddelcontrole) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1 \times 10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		

D	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$ M)	1×10^{-7} M	1×10^{-7} M	
E	E2 (1×10^{-9} M)	$1 \times 10^{-6,5}$ M	1×10^{-6} M	Buffercontrole
F	E2 ($1 \times 10^{-8,5}$ M)	1×10^{-6} M	1×10^{-5} M	
G	E2 (1×10^{-8} M)	$1 \times 10^{-5,5}$ M	1×10^{-4} M	Blanco (voor 'heet')**
H	E2 (1×10^{-7} M)	$1 \times 10^{-4,5}$ M	1×10^{-3} M	

[1] Voorbeeldindeling voor de microtiterplaat met standaarden die gelijktijdig met elk experiment gerund moet worden.

[2]Er zij op gewezen dat voor deze microtiterplaat de verdunningen worden gebruikt die zijn bereid in de verdunningsplaat voor de standaarden zoals beschreven in de voorgaande secties.

In dit voorbeeld is de zwakke binder noretynodrel (NE)

*een echte blanco, putje wordt niet gebruikt

**blanco wordt niet gebruikt tijdens de incubatie, maar wel ter bevestiging van de totaal toegevoegde radioactiviteit.

Tabel 5: Microtiterplaatindeling voor de bepaling van de competitieve binding, aanvullende platen voor teststoffen (TC) en plaatcontroles.

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
	Teststof 1 (TC-1)			**Teststof 2 (TC-2)**			**Teststof 3 (TC-3)**			**Controles**		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7} M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E2 (IC_{50})		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1 \times 10^{-4,5}$ M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (oplosmiddelcontrole)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

In dit voorbeeld is de zwakke binder noretynodrel (NE)

Afronding van de bepaling van de competitieve binding

37. Met uitzondering van de putjes voor totale binding en de blanco's (voor 'heet'), zoals weergegeven in tabel 6, moet aan elk putje 50 µl testbuffer worden toegevoegd, die eerst gemengd wordt met respectievelijk 10 µl oplosmiddelcontrole, referentie-oestrogeen (E2), zwakke binder, niet-binder, en teststoffen, en dan met 10 µl van een 5 nM [^{3}H]-17β-oestradioloplossing. Vervolgens wordt aan elk putje 30 µl ijskoude receptoroplossing toegevoegd, waarna voorzichtig wordt gemengd. De hrERα-oplossing moet als laatste reagens worden toegevoegd. De microtitertestplaten moeten 2 uur worden geïncubeerd bij kamertemperatuur (22° tot 28 °C).

Tabel 6: Het volume van de testcomponenten voor de bepaling van de competitieve binding aan de hrER,

microtiterplaten

Stappen van de bereiding per kolom		Alle putjes behalve TB	TB-putjes	Blanco (voor 'heet')
Volume componenten voor betreffende reactieputjes en volgorde toevoeging	Testbuffer bij kamertemperatuur	50 µl	60 µl	90 µl
	Ongelabeld E2, zwakke binder, niet-binder, oplosmiddel en teststoffen*	10 µl	-	-
	[^{3}H]-17β-oestradiol om op een eindconcentratie van 0,5 nM te komen (d.w.z. 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	Vooraf bepaalde hrERα-concentration (zie punten 12-13)	30 µl	30 µl	-
Totaal volume in elk testputje		100 µl	100 µl	100 µl

*zodanig bereid dat een aanvaardbare eindconcentratie oplosmiddel wordt verkregen

38. Nadat het aan de hrERα gebonden [^{3}H]-17β-oestradiol door de toevoeging aan elk putje van 100 µl ijskoude DCC-suspensie is gescheiden van het vrije [^{3}H]-17β-oestradiol, moet het aan de hrERα gebonden [^{3}H]-17β-oestradiol worden gekwantificeerd zoals beschreven in de punten 21-23 van aanhangsel 3 voor de bepaling van de verzadigingsbepaling.

39. De putjes G10-12 en H10-12 (in tabel 4 aangeduid als blanco's (voor 'heet')) vertegenwoordigen de desintegraties per minuut (dpm) van het [^{3}H]-oestradiol in 10 µl. Het aliquot van 10 µl moet direct aan de scintillatievloeistof worden toegevoegd.

Aanvaardbaarheidscriteria

Bepaling van de verzadigingsbinding

40. Naarmate de gebruikte concentratie [$_3$H]-17β-oestradiol oploopt, moet de curve voor de specifieke binding een plateau bereiken, waaruit blijkt dat de hrERα verzadigd raakt met ligand.

41. De specifieke binding bij 0,5 nM [^{3}H]-17β-oestradiol moet binnen het aanvaardbare bereik van 30 % tot 50 % van het gemiddelde van de in totaal gemeten radioactiviteit over alle testruns blijven. Incidentele, lichte afwijkingen buiten dit bereik zijn aanvaardbaar, maar als testruns structureel buiten dit bereik uitkomen of als voor een bepaalde testrun de specifieke binding ver erbuiten ligt, moet de eiwitconcentratie worden aangepast en moet de bepaling van de verzadigingsbinding worden herhaald.

42. De gegevens moeten een lineaire Scatchard-plot opleveren.

43. Er mag niet te veel niet-specifieke binding optreden. In het algemeen moet de waarde voor de niet-specifieke binding < 35 % van de totale binding zijn. Incidenteel mag de verhouding deze grens evenwel overschrijden bij het meten van zeer lage aantallen dpm voor de laagst geteste concentratie radioactief gelabeld 17β-oestradiol.

Bepaling van de competitieve binding

44. Naarmate de concentratie ongelabeld 17β-oestradiol oploopt, moet het [^{3}H]-17β-oestradiol van de receptor verdrijven op een manier die past bij competitieve binding op één bindingsplaats.

45. De IC_{50}-waarde voor het referentie-oestrogeen (d.w.z. 17β-oestradiol) moet ongeveer gelijk zijn aan de molaire concentratie [^{3}H]-17β-oestradiol plus de K_d zoals bepaald in de bepaling van de verzadigingsbinding.

46. De totale specifieke binding moet steeds binnen het aanvaardbare bereik van 40 ± 10 % blijven, wanneer het gemiddelde van de gemeten concentratie van de totale radioactiviteit die aan elk putje is toegevoegd, voor alle testruns 0,5 nM is. Incidentele, lichte afwijkingen buiten dit bereik zijn aanvaardbaar, maar als testruns structureel buiten dit bereik uitkomen of als voor een bepaalde testrun de specifieke binding ver erbuiten ligt, moet de eiwitconcentratie worden aangepast.

47. Het oplosmiddel mag geen invloed hebben op de gevoeligheid en reproduceerbaarheid van de bepaling. De resultaten van de oplosmiddelcontrole (TB-putjes) worden vergeleken met de buffercontrole om te verifiëren dat het oplosmiddel het testsysteem niet beïnvloedt. Als het oplosmiddel geen invloed heeft op de bepaling, moeten de resultaten van de oplosmiddel- en de buffercontrole vergelijkbaar zijn.

48. De niet-binder mag niet meer dan 25 % van het [^{3}H]-17β-oestradiol van de hrERα verdrijven, wanneer wordt getest tot 10^{-3} M (OTES) of 10^{-4} M (DBP).

49. De prestatiecriteria voor het referentie-oestrogeen en de twee zwakke binders (bv. noretynodrel of norethisteron) zijn tot stand gekomen op basis van gegevens uit de valideringsstudie voor de CERI-hrER-bindingsbepaling (bijlage N van referentie 2). De 95 %-betrouwbaarheidsintervallen komen voort uit de gemiddelden ± SD (n) van alle controleruns in de vier laboratoria die aan de valideringsstudie hebben deelgenomen. Er zijn 95 %-betrouwbaarheidsintervallen berekend voor de curvefittingsparameters (d.w.z. top, basis, Hill-coëfficiënt en log(IC_{50})) van het referentie-oestrogeen en de zwakke binders en voor de log_{10}RBA van de zwakke binders ten opzichte van het referentie-oestrogeen. In tabel 1 zijn de verwachte bereiken voor de curvefittingsparameters weergegeven, die als prestatiecriteria kunnen worden gebruikt. In de praktijk kan het bereik van de IC_{50} licht variëren afhankelijk van de experimenteel afgeleide K_d van het receptorpreparaat en de voor de bepaling gebruikte ligandconcentratie.

50. Voor de curvefittingsparameters voor de teststoffen zijn geen prestatiecriteria opgesteld vanwege het brede spectrum aan bestaande potentiële teststoffen en de varia in potentiële affiniteiten en uitslagen (bv. volledig gefitte, gedeeltelijk gefitte of geen gefitte curve). De resultaten van elke testrun voor een teststof moeten evenwel worden geëvalueerd op basis van professioneel oordeel. Er moet een voldoende breed bereik van concentraties van de teststof worden gebruikt om de top van de competitieve curve (bv. 90-100 % binding) duidelijk te kunnen bepalen. De variabiliteit tussen de duplo's van elke teststofconcentratie

en tussen de drie gelijktijdige testruns moet binnen redelijke grenzen blijven en wetenschappelijk verdedigbaar zijn. De controles van elke testrun voor een teststof moeten de voor deze CERI-bepaling gerapporteerde prestatiemetingen benaderen en consistent zijn met de historische controlegegevens van elk betreffende laboratorium.

ANALYSE VAN DE GEGEVENS

Bepaling van de verzadigingsbinding

51. Zowel de totale als de niet-specifieke binding wordt gemeten. Op basis van deze waarden wordt de specifieke binding van oplopende concentraties [^{3}H]-17β-oestradiol in evenwichtstoestand berekend door de niet-specifieke binding van de totale binding af te trekken. Wanneer de specifieke binding wordt uitgezet tegen de concentratie [^{3}H]-17β-oestradiol moet de grafiek een plateau bereiken voor de maximale specifieke binding, die overeenkomt met de verzadiging van de hrERα met het [^{3}H]-17β-oestradiol. Bovendien moet een analyse van de gegevens blijk geven van de binding van het [^{3}H]-17β-oestradiol aan één bindingsplaats met een hoge affiniteit. De curve voor de verzadigingsbinding moet de niet-specifieke, totale en specifieke binding weergeven. Voor de verdere analyse van deze gegevens moet een niet-lineaire regressieanalyse worden gebruikt (bv. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995), waarna de gegevens worden gepresenteerd in de vorm van een Scatchard-plot.

52. Bij de analyse van de gegevens moeten B_{max} en K_d worden bepaald op basis van alleen de gegevens voor de totale binding, waarbij wordt aangenomen dat de niet-specifieke binding lineair is, tenzij het gebruik van een andere methode wordt onderbouwd. Bovendien moet voor het bepalen van de beste fit robuuste regressie worden toegepast, tenzij een rechtvaardiging wordt gegeven voor een afwijkende keuze. De robuuste-regressiemethode moet worden vermeld. Bij het bepalen van B_{max} en K_d uit gegevens voor de verzadigingsbinding moet altijd worden gecorrigeerd voor liganddepletie (bv. met behulp van de methode van Swillens, 1995).

Bepaling van de competitieve binding

53. De competitievebindingscurve wordt uitgezet als de specifieke binding van [^{3}H]-17β-oestradiol tegen de concentratie (log10-eenheden) van de competitor. De concentratie waarbij de teststof de maximale specifieke binding van [^{3}H]-17β-oestradiol voor 50 % remt, is de IC_{50}-waarde.

54. De log(IC_{50})-waarden voor de positieve controles (bv. het referentie-oestrogeen en de zwakke binder) moeten worden geschat met behulp van software voor niet-lineaire fitting van de curve die geschikt is voor het fitten van een Hill-vergelijking met vier parameters (bv. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Bij het fitten van de curven moeten de top, basis, Hill-coëfficiënt, en log(IC_{50}) over het algemeen onbegrensd blijven. Voor het bepalen van de beste fit moet robuuste regressie worden toegepast, tenzij een rechtvaardiging wordt gegeven voor een afwijkende keuze. Er moet niet worden

gecorrigeerd voor liganddepletie. Na de eerste analyse moet voor elke bindingscurve worden geverifieerd op een goede fit ten opzichte van het model. De relatieve bindingsaffiniteit (RBA) voor de zwakke binder moet worden berekend als een percentage van de log(IC_{50}) voor de zwakke binder ten opzichte van de log(IC_{50}) voor 17β-oestradiol. De resultaten van de positieve controles en de controle met de niet-binder moeten worden beoordeeld aan de hand van de maatstaven voor de prestaties van de bepaling in de punten 44-49 van aanhangsel 3.

55. De gegevens voor alle teststoffen moeten worden geanalyseerd volgens een trapsgewijze benadering, zodat de gegevens correct worden beoordeeld en elke competitievebindingscurve correct wordt ingedeeld. Aanbevolen wordt om elke testrun voor een teststof eerst te onderwerpen aan een gestandaardiseerde gegevensanalyse die identiek is aan de gegevensanalyse die werd gebruikt voor het referentie-oestrogeen en de zwakkebindercontroles (zie punt 54 van aanhangsel 3). Zodra deze is afgerond, moet een technische beoordeling van de curvefittingsparameters worden verricht, alsmede een visuele inspectie van de mate waarin de gegevens overeenkomen met de gegenereerde competitievebindingscurve voor elke testrun. Bij deze technische beoordeling zijn een waargenomen concentratie-afhankelijke afname van het percentage specifiek gebonden [^{3}H]-17β-oestradiol, een geringe variabiliteit tussen de technische duplo's van elke teststofconcentratie en de consistentie in de fittingsparameters tussen de drie testruns een goede indicatie dat de bepaling en de gegevensanalyses correct zijn uitgevoerd.

Gegevensinterpretatie

56. Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt een teststof als binder voor de hrERα beschouwd als er een bindingscurve kan worden gefit en het laagste punt op de responscurve binnen het bereik van de gegevens overeenkomt met minder dan 50 % binding (figuur 1).

57. Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt een teststof als niet-binder voor de hrERα beschouwd als:

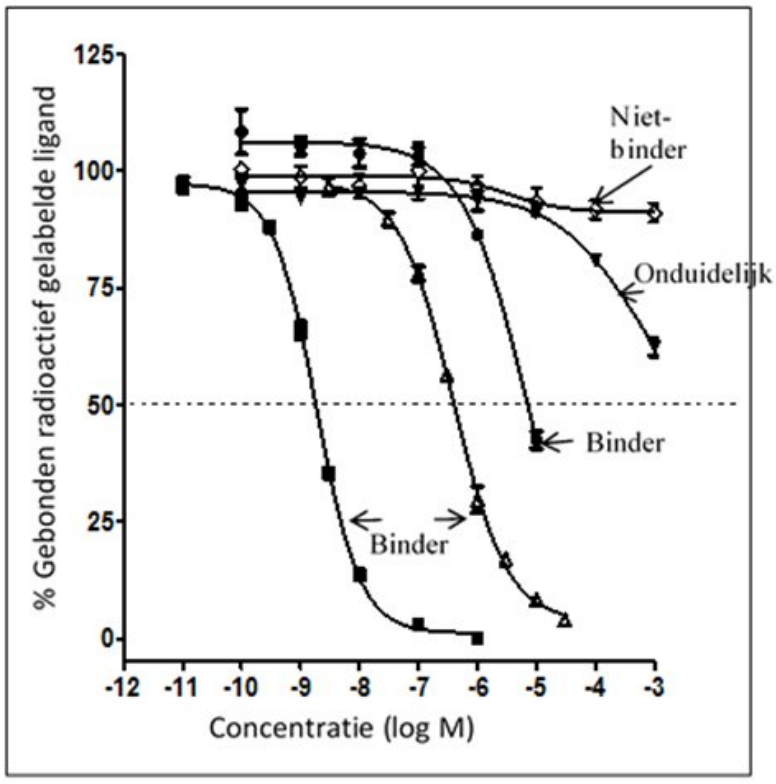
- er een bindingscurve gefit kan worden en het laagste punt op de gefitte responscurve binnen het bereik van de gegevens overeenkomt met meer dan 75 % binding; of
- er geen bindingscurve kan worden gefit en het laagste, niet-afgevlakte gemiddelde bindingspercentage van alle concentratiegroepen binnen de gegevens overeenkomt met meer dan 75 % binding.

58. Als aan geen van de bovenstaande voorwaarden wordt voldaan (bv. als het laagste punt op de gefitte responscurve overeenkomt met 76 tot 51 % binding) wordt de teststof als 'onduidelijk' beschouwd.

Tabel 7: Criteria voor de indeling van een teststof op basis van de competitievebindingscurve.

Indeling	Criterium
Binder[a]	Er kan een curve worden gefit. • **Het laagste punt op de responscurve binnen het bereik van de gegevens komt overeen met minder dan 50 % binding.**
Niet-binder[b]	Als er een curve kan worden gefit, • **komt het laagste punt op de gefitte responscurve binnen het bereik van de gegevens overeen met meer dan 75 % binding.** Als er geen curve kan worden gefit, • **komt het laagste, niet-afgevlakte gemiddelde bindingspercentage van alle concentratiegroepen binnen de gegevens overeen met meer dan 75 % binding.**
Onduidelijk[c]	Een beoordeelbare testrun die noch als binder, noch als niet-binder kan worden ingedeeld (bv. het laagste punt op de gefitte responscurve komt overeen met 76 tot 51 % binding).

Figuur 1: Voorbeelden van de indeling van een teststof met behulp van een competitievebindingscurve.



59. De verschillende testruns die binnen een laboratorium voor een teststof zijn uitgevoerd, worden gecombineerd door aan elke testrun numerieke waarden toe te kennen en het gemiddelde van deze waarden te nemen, zoals weergegeven in tabel 8. De resultaten van de

gecombineerde testruns binnen elk laboratorium worden vergeleken met de verwachte indeling voor elke teststof.

Tabel 8: Methode voor de indeling van een teststof op basis van meerdere testruns binnen hetzelfde laboratorium

Toekenning van een waarde aan elke testrun:	
Indeling	**Numerieke waarde**
Binder	2
Onduidelijk	1
Niet-binder	0
Indeling op basis van het gemiddelde van de numerieke waarden van de testruns:	
Indeling	**Numerieke waarde**
Binder	Gemiddelde ≥ 1,5
Onduidelijk	0,5 ≤ Gemiddelde < 1,5
Niet-binder	Gemiddelde < 0,5

TESTVERSLAG

60. Zie punt 24 van "COMPONENTEN VAN DE hrER-BINDINGSBEPALING" van deze testmethode.

Aanhangsel 3.1

TERMENLIJST

[^{3}H]E2: met radioactief tritium gelabeld 17β-oestradiol.

DCC: met dextraan beklede kool.

Duplo: een van de meerdere putjes in één testrun die dezelfde inhoud in dezelfde concentraties bevatten en die gelijktijdig worden getest. In dit protocol wordt elke concentratie van de teststof in drievoud getest; dat wil zeggen bij elke concentratie van de teststof worden er drie duplo's gelijktijdig getest.

E2: ongelabeld 17β-oestradiol (inert).

hrERα: menselijke recombinante oestrogeenreceptor alfa (ligandbindingsdomein).

Testbuffer: 10 mM tris-HCl, pH 7,4, met 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM $NaVO_3$, 10 % glycerol, 0,2 mM leupeptine, 1 mM dithiotreïtol en 10 mg/ml runderserumalbumine.

Testrun: een volledige set van gelijktijdig gerunde testputjes van een microtiterplaat die alle benodigde gegevens oplevert voor het bepalen van de binding van een teststof aan de hrERα, namelijk de totale hoeveelheid aan het testputje toegevoegd [^{3}H]-17β-oestradiol, de maximale binding van [^{3}H]-17β-oestradiol aan de hrERα, de niet-specifieke binding en de totale binding bij verschillende teststofconcentraties). Een testrun zou uit slechts één testputje per concentratie kunnen bestaan, maar aangezien dit protocol testen in drievoud voorschrijft, bestaat een testrun uit drie testputjes per concentratie. Bovendien schrijft dit protocol drie onafhankelijke (d.w.z. niet-gelijktijdige) testruns per chemische stof voor.

Aanhangsel 3.2

PLAATINDELING VOOR DE BEPALING VAN DE COMPETITIEVE BINDING

Plaat	Positie	Duplo	Type putje	Code putje	Code concentratie	Beginconcentratie competitor (M)	hrER-stamoplossing (µl)	Volume buffer (µl)	Volume tracer ('hete' E2) (µl)	Volume verdunningsplaat (µl)	Eindvolume (µl)	Eindconcentratie competitor (M)
S	A1	1	Blanco	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Blanco	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Blanco	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	'koud' E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	'koud' E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	'koud' E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	'koud' E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	'koud' E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	'koud' E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	'koud' E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	'koud' E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D3	3	'koud' E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	E1	1	'koud' E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	'koud' E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	'koud' E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	'koud' E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F2	2	'koud' E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F3	3	'koud' E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	G1	1	'koud' E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G2	2	'koud' E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	'koud' E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	'koud' E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	'koud' E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	'koud' E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	A4	1	noretynodrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	noretynodrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	noretynodrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	noretynodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	noretynodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	noretynodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	noretynodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C5	2	noretynodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C6	3	noretynodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	D4	1	noretynodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	noretynodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	noretynodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	noretynodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E5	2	noretynodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E6	3	noretynodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	F4	1	noretynodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	noretynodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	noretynodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	noretynodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G5	2	noretynodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G6	3	noretynodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06

Plaatindeling voor de bepaling van de competitieve binding

Plaat	Positie	Duplo	Type putje	Code putje	Code concentratie	Beginconcentratie competitor (M)	hrER-stamoplossing (µl)	Volume buffer (µl)	Volume tracer ('hete' E2) (µl)	Volume verdunningsplaat (µl)	Eindvolume (µl)	Eindconcentratie competitor (M)
S	H4	1	noretynodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H5	2	noretynodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H6	3	noretynodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8DBP7	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES88	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	A10	1	totale binding	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
S	A11	2	totale binding	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
S	A12	3	totale binding	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
S	B10	4	totale binding	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
S	B11	5	totale binding	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
S	B12	6	totale binding	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-
S	C10	1	'koud' E2 (hoog)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	'koud' E2 (hoog)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	'koud' E2 (hoog)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	'koud' E2 (hoog)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D11	5	'koud' E2 (hoog)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D12	6	'koud' E2 (hoog)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	Buffercontrole	BC	BC1	-	-	100	-	-	100	-
S	E11	2	Buffercontrole	BC	BC2	-	-	100	-	-	100	-
S	E12	3	Buffercontrole	BC	BC3	-	-	100	-	-	100	-
S	F10	4	Buffercontrole	BC	BC4	-	-	100	-	-	100	-
S	F11	5	Buffercontrole	BC	BC5	-	-	100	-	-	100	-
S	F12	6	Buffercontrole	BC	BC6	-	-	100	-	-	100	-
S	G10*	1	Blanco (voor	Heet	H1	-	90	-	10	-	100	-
S	G11*	2	Blanco (voor	Heet	H2	-	90	-	10	-	100	-
S	G12*	3	Blanco (voor	Heet	H3	-	90	-	10	-	100	-
S	H10*	4	Blanco (voor	Heet	H4	-	90	-	10	-	100	-
S	H11*	5	Blanco (voor	Heet	H5	-	90	-	10	-	100	-
S	H12	6	Blanco (voor	Heet	H6	-	90	-	10	-	100	-

*: Er zij op gewezen dat de 'hot' (heet) putjes tijdens de incubatie leeg zijn. De 10 µl wordt alleen toegevoegd voor de

scintillatietelling.

Plaatindeling voor de bepaling van de competitieve binding

Plaat	Positie	Duplo	Type putje	Code putje	Code concentratie	Beginconcentratie competitor (M)	hrER-stamoplossing (µl)	Volume buffer (µl)	Volume tracer ('hete' E2) (µl)	Volume verdunningsplaat (µl)	Eindvolume (µl)	Eindconcentratie competitor (M)
P1	A1	1	Onbekend 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	Onbekend 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	Onbekend 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	Onbekend 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	Onbekend 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	Onbekend 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	Onbekend 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	Onbekend 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	Onbekend 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D1	1	Onbekend 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	Onbekend 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	Onbekend 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	Onbekend 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	Onbekend 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	Onbekend 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	Onbekend 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	Onbekend 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	Onbekend 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	Onbekend 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	Onbekend 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	Onbekend 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	Onbekend 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	Onbekend 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H3	3	Onbekend 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	Onbekend 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	Onbekend 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	Onbekend 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	Onbekend 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	Onbekend 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	Onbekend 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	Onbekend 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	Onbekend 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	Onbekend 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	Onbekend 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	Onbekend 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	Onbekend 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	Onbekend 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E5	2	Onbekend 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	Onbekend 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	Onbekend 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	Onbekend 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	Onbekend 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	Onbekend 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	Onbekend 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	Onbekend 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	Onbekend 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	Onbekend 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	Onbekend 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

Plaatindeling voor de bepaling van de competitieve binding

Plaat	Positie	Duplo	Type putje	Code putje	Code concentratie	Beginconcentratie competitor (M)	hrER-stamoplossing (µl)	Volume buffer (µl)	Volume tracer ('hete' E2) (µl)	Volume verdunningsplaat (µl)	Eindvolume (µl)	Eindconcentratie competitor (M)
P1	A7	1	Onbekend 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	Onbekend 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A9	3	Onbekend 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B7	1	Onbekend 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	Onbekend 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	Onbekend 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	Onbekend 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	Onbekend 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	Onbekend 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	Onbekend 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	Onbekend 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	Onbekend 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	Onbekend 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	Onbekend 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	Onbekend 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	Onbekend 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	Onbekend 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F9	3	Onbekend 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	Onbekend 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	Onbekend 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	Onbekend 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	Onbekend 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	Onbekend 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	Onbekend 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	Controle E2	S	E2max1	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	Controle E2	S	E2max2	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	Controle E2	S	E2max3	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	Controle E2	S	E2IC501	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B11	2	Controle E2	S	E2IC502	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	Controle E2	S	E2IC503	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	C10	1	Controle NE	S	Nemax1	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	Controle NE	S	Nemax2	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	Controle NE	S	Nemax3	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	Controle NE	S	NEIC501	NEIC50	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	Controle NE	S	NEIC502	NEIC50	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	Controle NE	S	NEIC503	NEIC50	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	'koud' E2 (hoog)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	'koud' E2 (hoog)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	'koud' E2 (hoog)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	'koud' E2 (hoog)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	'koud' E2 (hoog)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	'koud' E2 (hoog)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	G10	1	totale binding	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
P1	G11	2	totale binding	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
P1	G12	3	totale binding	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
P1	H10	4	totale binding	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
P1	H11	5	totale binding	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
P1	H12	6	totale binding	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-

Aanhangsel 4

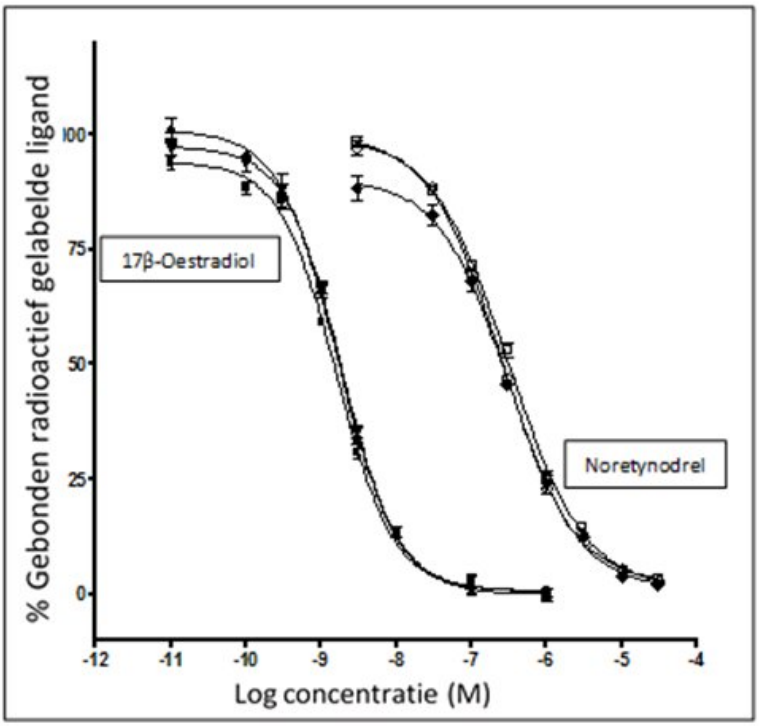
OVERWEGINGEN VOOR DE ANALYSE VAN DE GEGEVENS VAN DE BEPALING VAN DE COMPETITIEVE BINDING AAN DE HRER

1. Bij de bepaling van de competitieve binding aan de hrERα wordt de binding van één concentratie [^{3}H]-17β-oestradiol in aanwezigheid van oplopende concentraties van de teststof gemeten. De competitievebindingscurve wordt uitgezet als de specifieke binding van [^{3}H]-17β-oestradiol tegen de concentratie (log10-eenheden) van de competitor. De concentratie waarbij de teststof de maximale specifieke binding van [^{3}H]-17β-oestradiol voor 50 % remt, is de IC_{50}.

Gegevensanalyse voor het referentie-oestrogeen en de zwakke binder (1)

2. Voor verdere analyse worden de gegevens van de controletestruns getransformeerd (d.w.z. procentuele specifieke binding aan [^{3}H]-17β-oestradiol en de log-concentratie van de controlestof). De log(IC_{50})-waarden voor de positieve controles (bv. het referentie-oestrogeen en de zwakke binder) moeten worden geschat met behulp van software voor niet-lineaire fitting van de curve die geschikt is voor het fitten van een Hill-vergelijking met vier parameters (bv. BioSoft; GraphPad Prism) (2). Bij het fitten van de curven kunnen de top, basis, Hill-coëfficiënt, en log(IC_{50}) doorgaans onbegrensd blijven. Voor het bepalen van de beste fit moet robuuste regressie worden toegepast, tenzij een rechtvaardiging wordt gegeven voor een afwijkende keuze. De robuuste-regressiemethode moet worden vermeld. Correctie voor liganddepletie was voor geen van beide hrER-bepalingen (FW of CERI) nodig, maar kan eventueel worden overwogen. Na de eerste analyse moet voor elke bindingscurve worden gecontroleerd op een goede fit ten opzichte van het model. De relatieve bindingsaffiniteit (RBA) voor de zwakke binder kan worden berekend als een percentage van de log(IC_{50}) voor de zwakke binder ten opzichte van de log(IC_{50}) voor 17β-oestradiol. De resultaten van de positieve controles en de controle met de niet-binder moeten worden beoordeeld aan de hand van de maatstaven voor de prestaties van de bepaling en de aanvaardbaarheidscriteria zoals beschreven in deze testmethode (punt 20), aanhangsel 2 (FW-bepaling, punten 41-51) en aanhangsel 3 (CERI-bepaling, punten 41-51). In figuur 1 staan voorbeelden van 3 testruns voor het referentie-oestrogeen en de zwakke binder.

Figuur 1. Voorbeelden van de competitievebindingscurven voor het referentie-oestrogeen en de zwakkebindercontrole.



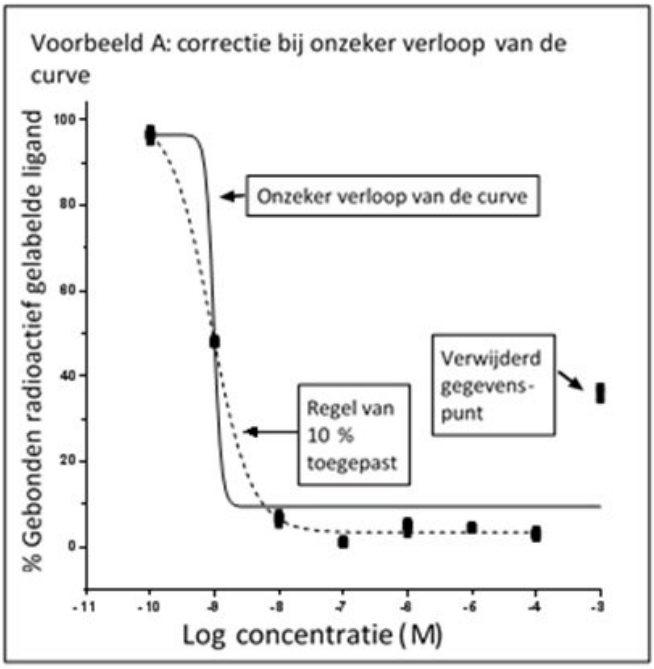
Analyse van de gegevens voor de teststoffen

3. De gegevens voor alle teststoffen moeten worden geanalyseerd volgens een trapsgewijze benadering, zodat de gegevens correct worden beoordeeld en elke competitievebindingscurve correct wordt ingedeeld. Elke testrun voor een teststof moet eerst aan een gestandaardiseerde gegevensanalyse worden onderworpen, die identiek is aan de gegevensanalyse die werd gebruikt voor het referentie-oestrogeen en de zwakkebindercontroles. Zodra deze is afgerond, moet een technische beoordeling van de curvefittingsparameters worden verricht, alsmede een visuele inspectie van de mate waarin de gegevens overeenkomen met de gegenereerde competitievebindingscurve voor elke testrun. Bij deze technische beoordeling zijn een waargenomen concentratie-afhankelijke afname van het percentage specifiek gebonden [^{3}H]-17β-oestradiol, een geringe variabiliteit tussen de technische duplo's van elke teststofconcentratie en de consistentie in de fittingsparameters tussen de drie testruns een goede indicatie dat de bepaling en de gegevensanalyses correct zijn uitgevoerd. De resultaten van elke testrun voor een teststof moeten worden geëvalueerd op basis van professioneel oordeel en de gegevens op basis

waarvan elke teststof wordt ingedeeld als binder of niet-binder moeten wetenschappelijk verdedigbaar zijn.

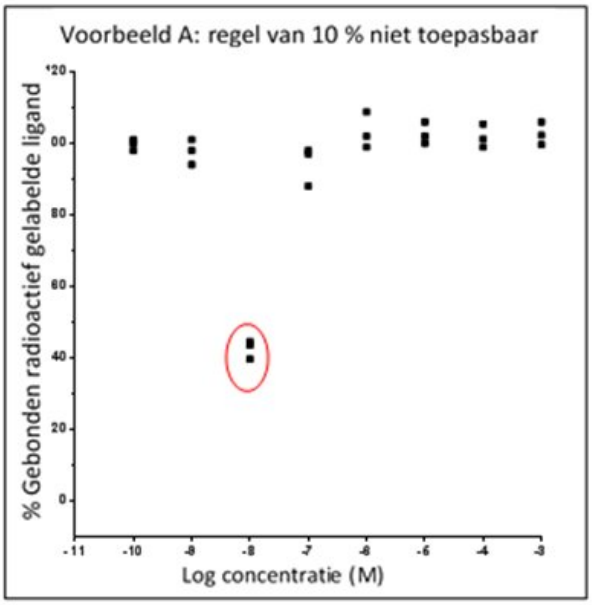
4. Het kan zo nu en dan gebeuren dat de hrER-bindingsgegevens aanvullende aandacht behoeven om op een passende manier geanalyseerd en geïnterpreteerd te worden. In eerdere onderzoeken zijn gevallen voorgekomen waarin de analyse en interpretatie van de gegevens voor competitieve binding aan de receptor een complex beeld lieten zien door een toename van het percentage specifieke binding wanneer teststoffen bij de hoogste concentraties werden getest (figuur 2). Dit is een bekend verschijnsel dat bij het gebruik van protocollen voor een aantal bepalingen van competitieve receptorbinding is opgetreden (3). In deze gevallen wordt bij lagere concentraties een concentratie-afhankelijke respons waargenomen, maar neemt de verdrijving van [^{3}H]17β-oestradiol niet langer af naarmate de concentratie van de teststof de oplosbaarheidsgrens nadert. In deze gevallen geven de gegevens voor de hogere concentraties aan dat de bepaling haar biologische grens heeft bereikt. Dit verschijnsel is bijvoorbeeld dikwijls gepaard gegaan met chemische onoplosbaarheid en neerslag bij hoge concentraties. Het kan ook betekenen dat bij de hoogste chemische concentraties de capaciteit van de met dextraan beklede kool voor het vasthouden van de ongebonden radioactief gelabelde ligand tijdens de scheidingsprocedure wordt overschreden. Door dergelijke gegevenspunten mee te nemen bij het fitten van competitievebindingsgegevens tot een sigmoïde curve kan het gebeuren dat het ER-bindingspotentieel van een teststof verkeerd wordt ingedeeld (figuur 2). Om dit te vermijden is in zowel het FW-protocol als het CERI-protocol voor de bepaling van hrER-binding een optie opgenomen om gegevenspunten waarbij het gemiddelde percentage specifiek gebonden [^{3}H]-17β-oestradiol van de duplo's 10 % of meer boven de gemiddelde waarde bij een lagere concentratie ligt, van de analyse uit te sluiten (dit wordt doorgaans de regel van 10 % genoemd). Deze regel mag maar eenmaal per curve worden toegepast en er moeten gegevens voor ten minste 6 concentraties overblijven om de curve correct te kunnen indelen.

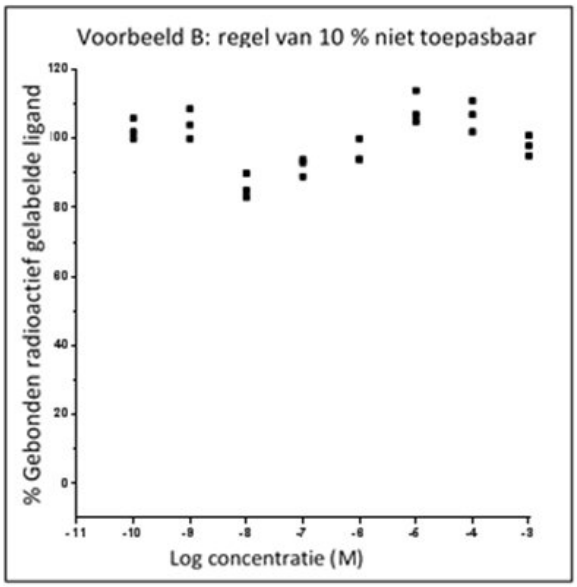
Figuur 2: Voorbeelden van competitievebindingscurven met en zonder toepassing van de regel van 10 %.



5. Per geval moet zorgvuldig worden overwogen of voor het corrigeren van de curve de regel van 10 % kan worden toegepast. Toepassing van de regel moet worden gereserveerd voor gevallen waarin er sterke aanwijzingen zijn dat het een hrER-binder betreft. Bij de uitvoering van experimenten voor de valideringsstudie van de FW-hrER-bindingsbepaling bleek de regel van 10 % soms een onbedoeld en onverwacht gevolg te hebben. Chemische stoffen waarbij geen interactie met de receptor optrad (d.w.z. werkelijke niet-binders), vertoonden rond de 100 % binding van de radioactieve ligand vaak een variabiliteit van meer dan 10 % over het hele bereik van geteste concentraties. Als de laagste waarde bij een lage concentratie optrad, kwamen de gegevens voor alle hogere concentraties in aanmerking om aan de hand van de regel van 10 % van de analyse te worden uitgesloten, ook al konden die concentraties dienen om vast te stellen dat de betreffende chemische stof een niet-binder is. In figuur 3 staan voorbeelden waarbij de regel van 10 % niet kan worden toegepast.

Figuur 3: Voorbeelden van competitievebindingsgegevens waarbij de regel van 10 % niet kan worden toegepast.


Voorbeeld A: regel van 10 % niet toepasbaar
% Gebonden radioactief gelabelde ligand
Log concentratie (M)


Voorbeeld B: regel van 10 % niet toepasbaar
% Gebonden radioactief gelabelde ligand
Log concentratie (M)

Referenties

(1) OESO (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

(2) Motulsky H. and Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, pp 187-191. Www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf

(3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.