



Raad van de
Europese Unie

Brussel, 25 februari 2019
(OR. en)

6800/19
ADD 2

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 2/2)

B.71 IN-VITROHUIDSENSIBILISATIE: TESTS OP BASIS VAN DE BELANGRIJKE GEBEURTENIS VAN ACTIVERING VAN DENDRITISCHE CELLEN OP DE ADVERSE OUTCOME PATHWAY (AOP) VOOR HUIDSENSIBILISATIE**ALGEMENE INLEIDING****Testmethode op basis van de belangrijke gebeurtenis van activering van dendritische cellen**

1. Een huidsensibiliserende stof is een stof die een allergische reactie uitlokt na contact met de huid, zoals gedefinieerd in het mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen van de Verenigde Naties (GHS) (1) en Verordening (EU) nr. 1272/2008 van de Europese Unie betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsel (CLP-verordening)¹. Er bestaat algemene overeenstemming over de belangrijkste biologische gebeurtenissen die aan de basis liggen van huidsensibilisatie. De huidige kennis van de chemische en biologische mechanismen die verband houden met huidsensibilisatie is samengevat in een Adverse Outcome Pathway (AOP) in het kader van het AOP-programma van de OESO (2), van de moleculaire inleidende gebeurtenis over de tussenliggende gebeurtenissen tot het schadelijke effect, te weten allergische contactdermatitis. In dit geval is de moleculaire inleidende gebeurtenis (d.w.z. de eerste belangrijke gebeurtenis) de covalente binding van elektrofiële stoffen aan nucleofiele centra in eiwitten in de huid. De tweede belangrijke gebeurtenis in deze AOP vindt plaats in de keratinocyten en omvat zowel ontstekingsreacties als veranderingen in genexpressie die samenhangen met specifieke signaalpaden in de cellen, zoals de paden die afhankelijk zijn van het antioxidant-/elektrofiel responselement (ARE). De derde belangrijke gebeurtenis is de activering van dendritische cellen. Deze gebeurtenis wordt gewoonlijk beoordeeld aan de hand van de expressie van specifieke markers op het celoppervlak. De vierde belangrijke gebeurtenis is de activering en proliferatie van T-cellen, die indirect wordt beoordeeld in de lokale lymfkliertest (LLKT) met muizen (3).

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.

2. Deze testmethode (TM) is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 442E (2017) van de OESO. Hierin worden in-vitrotests beschreven voor mechanismen die worden beschreven onder de belangrijke gebeurtenis van activering van dendritische cellen op de Adverse Outcome Pathway (AOP) voor huidsensibilisatie (2). De TM behelst tests die kunnen worden gebruikt om het onderscheid tussen huidsensibiliserende stoffen en niet-sensibiliserende stoffen te staven, in overeenstemming met het VN-GHS en de CLP-verordening.

De in deze TM beschreven tests zijn:

- Humanecellijnactiveringstest (h-CLAT)
 - U937-cellijnactiveringstest (U-SENSTM)
 - Interleukine-8-reportergenbepaling (IL-8 Luc bepaling)
3. De tests die in deze testmethode en de overeenkomstige OESO-testrichtlijn worden beschreven, kunnen verschillen wat betreft de gebruikte procedure voor het genereren van de gegevens en de meetresultaten, maar kunnen zonder onderscheid worden gebruikt om tegelijkertijd te voldoen aan de eisen die aan landen worden gesteld voor de testresultaten voor de belangrijke gebeurtenis van activering van dendritische cellen op de AOP voor huidsensibilisatie, en in aanmerking te komen voor de wederzijdse aanvaarding van gegevens van de OESO.

Achtergrond en beginselen van de tests die in deze testmethode op basis van een belangrijke gebeurtenis worden beschreven

4. De bepaling van de huidsensibilisatie ging meestal gepaard met het gebruik van proefdieren. Bij de klassieke methoden waarbij cavia's worden gebruikt, de maximalisatietest met cavia's (GMPT) van Magnusson-Kligman en de Buehler-test (TM B.6) (4), worden zowel de inductie- als de uitlokkingsfase van huidsensibilisatie beoordeeld. Ook de tests met muizen, de LLKT (TM B.42) (3) en de twee niet-radioactieve aanpassingen ervan, LLKT: AA (TM B.50) (5) en LLKT: BrdU-ELISA (TM B.51) (6), waarbij telkens uitsluitend de inductierespons wordt beoordeeld, zijn gangbaar geworden, aangezien deze beter zijn voor het dierenwelzijn dan tests met cavia's en het mogelijk maken om de inductiefase van huidsensibilisatie objectief te meten.
5. Onlangs zijn ook mechanistisch gebaseerde in-chemico- en in-vitrotestmethoden om de eerste belangrijke gebeurtenis (TM B.59; Direct Peptide Reactivity Assay (7)) en de tweede belangrijke gebeurtenis (TM B.60; ARE-Nrf2-luciferasetestmethode (8)) van de AOP voor huidsensibilisatie te bestuderen, aangenomen voor de beoordeling van het gevaar van huidsensibilisatie van chemische stoffen.

6. De in deze testmethode beschreven tests kwantificeren hetzij de verandering in de expressie van een of meer markers op het celoppervlak die gepaard gaat met de activering van monocysten en dendritische cellen na blootstelling aan sensibiliserende stoffen (bv. CD54, CD86), hetzij de veranderingen in de expressie van IL-8, een cytokine dat verband houdt met de activering van dendritische cellen. Van huidsensibiliserende stoffen is gerapporteerd dat ze de expressie van markers op het celoppervlak zoals CD40, CD54, CD80, CD83 en CD86 induceren, naast de inductie van pro-inflammatoire cytokinen, zoals IL-1 β en TNF- α , en verscheidene chemokinen waaronder IL-8 (CXCL8) en CCL3 (9) (10) (11) (12) die verband houden met de activering van dendritische cellen (2).
7. Desondanks volstaat informatie die werd verzameld met behulp van tests die de activering van dendritische cellen meten, als dusdanig niet altijd om te besluiten dat een chemische stof al dan niet huidsensibilisatie kan veroorzaken, aangezien activering van dendritische cellen slechts een van de belangrijke gebeurtenissen is op de AOP die aanleiding geeft tot huidsensibilisatie (2) (13). De gegevens die de in deze testmethode beschreven tests opleveren, kunnen daarom worden gebruikt ter ondersteuning van het onderscheid tussen huidsensibiliserende stoffen (d.w.z. VN-GHS/CLP-categorie 1) en niet-sensibiliserende stoffen in het kader van geïntegreerde test- en beoordelingsbenaderingen (Integrated Approaches to Testing and Assessment of IATA), mits ze worden gecombineerd met andere aanvullende informatie die bijvoorbeeld is afgeleid uit in-vitrotests waarin andere belangrijke gebeurtenissen binnen de AOP van huidsensibilisatie worden bestudeerd, of uit niet-testmethoden zoals een "read-across" van chemische analogen (13). Voorbeelden van het gebruik van gegevens die zijn gegenereerd met behulp van deze tests binnen zogenaamde Defined Approaches – d.w.z. benaderingen die zijn gestandaardiseerd zowel wat betreft de set van gebruikte informatiebronnen als wat betreft de procedure die op de gegevens is toegepast om er voorspellingen uit af te leiden – zijn gepubliceerd (13) en kunnen worden aangewend als bruikbare elementen in IATA's.
8. De in deze testmethode beschreven tests kunnen niet afzonderlijk worden gebruikt om huidsensibiliserende stoffen in te delen in de subcategorieën 1A en 1B zoals gedefinieerd door VN-GHS/CLP, voor autoriteiten die deze twee optionele sub categorieën toepassen, of om de potentie te voorspellen met het oog op besluiten inzake veiligheidsbeoordelingen. Naargelang van het regelgevingskader kunnen positieve resultaten op basis van deze methoden echter wel als dusdanig worden gebruikt om een chemische stof in te delen in VN-GHS/CLP-categorie 1.

9. De term "teststof" wordt in deze testmethode gebruikt om te verwijzen naar datgene dat wordt getest¹, en houdt geen verband met de toepasselijkheid van de tests op het testen van stoffen die uit één component bestaan, stoffen die uit meerdere componenten bestaan en/of mengsels. Er is momenteel slechts beperkte informatie beschikbaar over de toepasselijkheid van de tests op stoffen die uit meerdere componenten bestaan/mengsels (14) (15). De tests zijn 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 doel². Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is. Bovendien moet bij het testen op stoffen die uit meerdere componenten bestaan of op mengsels rekening worden gehouden met mogelijke interferentie van cytotoxische componenten met de waargenomen responsen.

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.

² Deze zin is voorgesteld en goedgekeurd op de WNT-vergadering van april 2014.

LITERATUUR

- (1) Verenigde Naties (VN) (2015). Mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen (GHS). Zesde herziene editie. New York & Genève: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Beschikbaar op: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.
- (2) OESO (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Beschikbaar op: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=E NV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=E NV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En).
- (3) Hoofdstuk B.42 van deze bijlage: huidsensibilisatie: lokale lymfkliertest. Hoofdstuk B.6 van deze bijlage: sensibilisatie van de huid.
- (4) Hoofdstuk B.50 van deze bijlage: huidsensibilisatie: lokale lymfkliertest: AA.
- (5) Hoofdstuk B.51 van deze bijlage: huidsensibilisatie: lokale lymfkliertest: BrdU-ELISA.
- (6) Hoofdstuk B.59 van deze bijlage: in-chemicohuidsensibilisatie: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA-test).
- (7) Hoofdstuk B.60 van deze bijlage: in-vitrohuidsensibilisatie: ARE-Nrf2-luciferasetestmethode.
- (8) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-96.
- (9) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 180:1841-7.
- (10) Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27:3031-8.
- (11) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390-8.

- (12) OESO (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Skin Sensitisation, bijlage 1 en bijlage 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs. Beschikbaar op: <https://community.oecd.org/community/iatass>.
- (13) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- (14) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

Aanhangsel 1

IN-VITROHUIDSENSIBILISATIE: HUMANECELLIJNACTIVERINGSTEST (H-CLAT)

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

1. De h-CLAT kwantificeert veranderingen in de expressie van markers op het celoppervlak die gepaard gaan met de activering van monocyt en dendritische cellen (d.w.z. CD86 en CD54), in de humane monocytischeleukemieceldlijn THP-1, na blootstelling aan sensibiliserende stoffen (1) (2). De gemeten expressieniveaus van de oppervlaktemarkers CD86 en CD54 worden vervolgens gebruikt om het onderscheid tussen huidsensibiliserende stoffen en niet-sensibiliserende stoffen te staven.
2. De h-CLAT is geëvalueerd in een valideringsstudie die werd gecoördineerd door het referentielaboratorium voor alternatieven voor dierproeven van de Europese Unie (EURL CEVMA) en in een latere onafhankelijke beoordeling door vakgenoten van het raadgevend wetenschappelijk comité van het CEVMA (ESAC). Op grond van al het beschikbare bewijsmateriaal en de inbreng van regelgevers en belanghebbenden werd de h-CLAT door het EURL CEVMA (3) aanbevolen voor gebruik in het kader van een IATA om het onderscheid tussen huidsensibiliserende stoffen en niet-sensibiliserende stoffen te staven met het oog op de gevarenindeling en etikettering. Voorbeelden van het gebruik van h-CLAT-gegevens in combinatie met andere informatie worden beschreven in de literatuur (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).
3. De h-CLAT bleek overdraagbaar te zijn naar laboratoria met ervaring in het kweken van cellen en flowcytometrieanalyse. De verwachte reproduceerbaarheid van voorspellingen op basis van deze test binnen laboratoria en tussen verschillende laboratoria bedraagt 80 % (3) (12). De resultaten van de valideringsstudie (13) en andere gepubliceerde onderzoeken (14) duiden er over het geheel genomen op dat, vergeleken met LLKT-resultaten, de nauwkeurigheid in het onderscheiden van huidsensibiliserende stoffen (d.w.z. VN-GHS/CLP-categorie 1) en niet-sensibiliserende stoffen 85 % bedraagt (N=142), met een gevoeligheid van 93 % (94/101) en een specificiteit van 66 % (27/41) (op basis van een heranalyse door het EURL CEVMA (12), waarbij rekening werd gehouden met alle bestaande gegevens en waarbij negatieve uitslagen voor chemische stoffen met een log Kow van meer dan 3,5 buiten beschouwing werden gelaten, zoals beschreven in punt 4). Bij de h-CLAT is de kans dat valsnegatieve voorspellingen betrekking hebben op chemische stoffen met een lage tot gemiddelde potentie voor huidsensibilisatie (d.w.z. VN-GHS/CLP-subcategorie 1B) hoger dan dat ze betrekking hebben op chemische stoffen met een hoge potentie voor huidsensibilisatie (d.w.z. VN-GHS/CLP-subcategorie 1A) (4) (13) (15). Gecombineerd geeft deze informatie aan dat de h-CLAT-methode nuttig kan zijn om

het gevaar van huidsensibilisatie te bepalen. De waarden die hier worden vermeld voor de nauwkeurigheid van de h-CLAT als losstaande test, vormen echter slechts een indicatie, aangezien de test moet worden bekeken in combinatie met andere informatiebronnen in de context van een IATA en in overeenstemming met hetgeen hierboven bepaald is in de punten 7 en 8 in de algemene inleiding. Bovendien moet bij de beoordeling van methoden zonder dierproeven voor huidsensibilisatie rekening worden gehouden met het feit dat de LLKT en andere dierproeven de situatie van mensen mogelijk niet volledig weerspiegelen.

4. Op basis van de op dit moment beschikbare gegevens is gebleken dat de h-CLAT kan worden toegepast op teststoffen die verschillende organische functionele groepen, reactiemechanismen, potenties voor huidsensibilisatie (zoals bepaald bij in-vivo-onderzoek) en fysisch-chemische eigenschappen beslaan (3) (14) (15). De h-CLAT-methode is van toepassing op teststoffen die oplosbaar zijn of een stabiele dispersie vormen (d.w.z. een colloïde of suspensie waarin de teststof niet bezinkt of zich van het oplosmiddel/vehiculum afscheidt in verschillende fasen) in een geschikt oplosmiddel/vehiculum (zie punt 14). Teststoffen met een log Kow van meer dan 3,5 leveren vaker valsnegatieve uitslagen op (14). Om die reden moeten negatieve uitslagen bij teststoffen met een log Kow van meer dan 3,5 buiten beschouwing worden gelaten. Positieve uitslagen bij teststoffen met een log Kow van meer dan 3,5 kunnen echter wel worden gebruikt om de identificatie van de teststof als huidsensibiliserende stof te staven. Bovendien kunnen ook prohaptenen (d.w.z. stoffen die enzymactivering nodig hebben, bijvoorbeeld via P450-enzymen) en prehaptenen (d.w.z. stoffen die worden geactiveerd door oxidatie), in het bijzonder met een trage oxidatiesnelheid, negatieve resultaten geven in de h-CLAT (15) vanwege de beperkte metabole capaciteit van de gebruikte cellijn (16) en vanwege de omstandigheden bij het experiment. Fluorescerende teststoffen kunnen worden beoordeeld met de h-CLAT (17). Sterk fluorescerende teststoffen die op dezelfde golflengte uitzenden als fluoresceïne-isothiocyanaat (FITC) of als propidiumjodide (PI) zullen echter interfereren met de flowcytometrische detectie en kunnen dus niet correct worden beoordeeld wanneer gebruikgemaakt wordt van met FITC geconjugeerde antilichamen of PI. In dat geval kunnen respectievelijk andere met fluorochoorm gelabelde antilichamen of andere cytotoxiciteitsmarkers worden gebruikt, zolang kan worden aangetoond dat ze vergelijkbare resultaten opleveren als de met FITC gelabelde antilichamen (zie punt 24) of PI (zie punt 18), bijvoorbeeld door de stoffen voor bekwaamheidstoetsing in aanhangsel 1.2 te testen. In het licht van het bovenstaande moeten negatieve resultaten worden geïnterpreteerd in de context van de vermelde beperkingen en samen met andere informatiebronnen in het kader van een IATA. In gevallen waarin wordt aangetoond dat de h-CLAT-methode niet toepasselijk is op andere specifieke categorieën teststoffen, dient de methode niet te worden gebruikt voor die specifieke categorieën.

5. Zoals hierboven beschreven, helpt de h-CLAT-methode om huidsensibiliserende stoffen te onderscheiden van niet-sensibiliserende stoffen. Deze testmethode kan echter ook bijdragen aan de beoordeling van de sensibiliserende potentie (4) (5) (9) wanneer zij wordt gebruikt in het kader van een geïntegreerde aanpak zoals een IATA. Er moet niettemin nog meer onderzoek worden verricht, bij voorkeur op basis van gegevens die zijn verzameld bij mensen, om te bepalen hoe de resultaten van de h-CLAT kunnen worden benut bij de beoordeling van de potentie.
6. Definities worden gegeven in aanhangsel 1.1.

PRINCIPE VAN DE TEST

7. De h-CLAT-methode is een in-vitrobepaling die veranderingen in de expressie van markers op het celoppervlak (d.w.z. CD86 en CD54) op een humane monocytischeleukemieceldlijn, THP-1, kwantificeert nadat de cellen 24 uur aan de teststof zijn blootgesteld. Deze oppervlaktemoleculen zijn kenmerkende markers van de activering van monocytische THP-1-cellen. Ze kunnen de activering van dendritische cellen, die een cruciale rol speelt bij de priming van T-cellen, nabootsen. De veranderingen in de expressie van oppervlaktemarkers worden gemeten met behulp van flowcytometrie, nadat de cellen zijn gekleurd met fluorochroom-gelabelde antilichamen. Tegelijkertijd wordt een cytotoxiciteitsmeting uitgevoerd om te beoordelen of bij subcytotoxische concentraties opregulatie van de expressie van oppervlaktemarkers plaatsvindt. De relatieve fluorescentie-intensiteit van oppervlaktemarkers vergeleken met de oplosmiddel-/vehiculumcontrole wordt berekend en gebruikt in het voorspellingsmodel (zie punt 26) om het onderscheid tussen huidsensibiliserende stoffen en niet-sensibiliserende stoffen te staven.

AANTONING VAN BEKWAAMHEID

8. Vooraleer over te gaan tot routinegebruik van de onder testmethode B.71 vallende test die in dit aanhangsel wordt beschreven, moeten laboratoria hun technische bekwaamheid aantonen met de 10 stoffen voor bekwaamheidstoetsing die in aanhangsel 1.2 worden genoemd. Gebruikers van de test moeten bovendien een historische gegevensbank bijhouden van de gegevens die het resultaat zijn van de reactiviteitscontroles (zie punt 11), de positieve controles en oplosmiddel-/vehiculumcontroles (zie punten 20-22). Zij moeten deze gegevens gebruiken om te bevestigen dat de reproduceerbaarheid van de test in hun laboratorium in de loop van de tijd gehandhaafd blijft.

PROCEDURE

9. Deze testmethode is gebaseerd op protocol nr. 158 betreffende h-CLAT van de DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation (DB-ALM) (18), het protocol dat werd gebruikt voor de door het EURL CEVMA gecoördineerde valideringsstudie. Wanneer de h-CLAT-methode in het laboratorium wordt ingevoerd en toegepast, wordt aanbevolen om dit protocol te volgen. Hieronder worden de belangrijkste onderdelen en procedures beschreven van de h-CLAT-methode, die uit twee stappen bestaat: *dosisbepalingstest* en *meting van de CD86/CD54-expressie*.

Celpreparaten

10. Voor het toepassen van de h-CLAT-methode moet de humane monocytischeleukemieceldlijn, THP-1, worden gebruikt. Aanbevolen wordt cellen (TIB-202™) te betrekken van een goed gekwalificeerde celbank, zoals de American Type Culture Collection.
11. THP-1-cellen worden gekweekt, bij 37 °C in een vochtige atmosfeer met 5 % CO₂, in RPMI-1640-medium, aangevuld met 10 % foetaal runderserum (FBS), 0,05 mM 2-mercapto-ethanol, 100 eenheden/ml penicilline en 100 µg/ml streptomycine. Penicilline en streptomycine kunnen in het kweekmedium achterwege worden gelaten. In dat geval moeten gebruikers evenwel verifiëren dat de afwezigheid van antibiotica in het kweekmedium niet van invloed is op de resultaten, bijvoorbeeld door de stoffen voor bekwaamheidstoetsing die in aanhangsel 1.2 worden genoemd, te testen. Om het risico van verontreiniging tot een minimum te beperken, moeten hoe dan ook goede celkweekpraktijken worden gevolgd, ongeacht of het celkweekmedium wel of niet antibiotica bevat. THP-1-cellen worden stelselmatig iedere 2-3 dagen geënt met een dichtheid van 0,1 tot $0,2 \times 10^6$ cellen/ml. Ze moeten op een dichtheid van 0,1 tot $1,0 \times 10^6$ cellen/ml worden gehouden. Voordat de cellen voor tests worden gebruikt, moet hun geschiktheid worden vastgesteld aan de hand van een reactiviteitscontrole. De reactiviteitscontrole van de cellen moet worden uitgevoerd met behulp van de positieve controles 2,4-dinitrochlorobenzeen (DNCB) (CAS-nr. 97-00-7, zuiverheid $\geq 99\%$) en nikkelsulfaat (NiSO₄) (CAS-nr. 10101-97-0, zuiverheid $\geq 99\%$), en de negatieve controle melkzuur (CAS-nr. 50-21-5, zuiverheid $\geq 85\%$), twee weken na het ontdooien. Zowel DNCB als NiSO₄ moeten een positieve respons opleveren van beide oppervlaktemarkers CD86 en CD54, en melkzuur moet een negatieve respons opleveren van beide oppervlaktemarkers CD86 en CD54. Voor de test mogen uitsluitend de cellen worden gebruikt die de reactiviteitscontrole met goed gevolg hebben doorstaan. Cellen kunnen tot maximaal twee maanden na het ontdooien worden vermeerderd. Het aantal passages mag niet hoger zijn dan 30. De reactiviteitscontrole moet worden uitgevoerd in overeenstemming met de procedures die in de punten 20-24 worden beschreven.
12. Voor het testen worden THP-1-cellen geënt met een dichtheid van ofwel $0,1 \times 10^6$ cellen/ml ofwel $0,2 \times 10^6$ cellen/ml, en gedurende respectievelijk 72 uur of

48 uur voorgekweekt in kweekflessen. Het is belangrijk dat in elk experiment de celdichtheid in de kweekfles direct na het voorkweken zo consistent mogelijk is (door een van de twee hierboven beschreven voorkweekomstandigheden te gebruiken). De celdichtheid in de kweekfles direct na het voorkweken zou namelijk van invloed kunnen zijn op de CD86/CD54-expressie die door allergenen wordt geïnduceerd (19). Op de dag dat de test wordt uitgevoerd, worden cellen die uit de kweekfles worden geoogst, geresuspendeerd met vers kweekmedium bij een dichtheid van 2×10^6 cellen/ml. Vervolgens worden de cellen verdeeld over een 24-putjesplaat met vlakke bodem met 500 μ l (1×10^6 cellen/putje) of een 96-putjesplaat met vlakke bodem met 80 μ l ($1,6 \times 10^5$ cellen/putje).

Dosisbepalingstest

13. Er wordt een *dosisbepalingstest* uitgevoerd om de CV75 vast te stellen, d.w.z. de concentratie van de teststof waarbij de cellevensvatbaarheid (cell viability, CV) 75 % is, vergeleken met de oplosmiddel-/vehiculumcontrole. De CV75-waarde wordt gebruikt om de concentratie van teststoffen te bepalen voor de *meting van de CD86/CD54-expressie* (zie punten 20-24).

Bereiding van test- en controlestoffen

14. De test- en controlestoffen worden bereid op de dag van de tests. Voor de h-CLAT-methode worden teststoffen opgelost of stabiel gedispergeerd (zie ook punt 4). De eerste optie voor een oplosmiddel/vehiculum is een zoutoplossing of medium. Als de teststof niet oplosbaar is in deze twee oplosmiddelen/vehicula is dimethylsulfoxide (DMSO, zuiverheid ≥ 99 %) een tweede optie. De teststoffen worden opgelost of stabiel gedispergeerd tot uiteindelijke concentraties van 100 mg/ml (in zoutoplossing of medium) of 500 mg/ml (in DMSO). Andere oplosmiddelen/vehicula dan die welke hierboven worden beschreven, mogen worden gebruikt als daarvoor een voldoende wetenschappelijke onderbouwing wordt gegeven. De stabiliteit van de teststof in het uiteindelijke oplosmiddel/vehiculum moet in aanmerking worden genomen.
15. Uitgaande van de 100 mg/ml (in zoutoplossing of medium) of 500 mg/ml (in DMSO) stamoplossingen van de teststoffen moeten de volgende verdunningsstappen worden gevolgd:
 - Voor zoutoplossing of medium als oplosmiddel/vehiculum: Er worden acht stamoplossingen (acht concentraties) bereid, door middel van seriële verdunningen met een factor twee met behulp van het bijbehorende oplosmiddel/vehiculum. Deze stamoplossingen worden vervolgens 50 keer verdund in kweekmedium (werkoplossingen). Als de hoogste uiteindelijke concentratie in de plaat van 1 000 μ g/ml niet-toxisch is, moet de maximumconcentratie opnieuw worden bepaald door een nieuwe cytotoxiciteitstest uit

te voeren. De uiteindelijke concentratie in de plaat mag voor teststoffen die opgelost of stabiel gedispergeerd zijn in zoutoplossing of medium, niet hoger zijn dan 5 000 µg/ml.

- Voor DMSO als oplosmiddel/vehiculum: Er worden acht stamoplossingen (acht concentraties) bereid, door middel van seriële verdunningen met een factor twee met behulp van het bijbehorende oplosmiddel/vehiculum. Deze stamoplossingen worden vervolgens 250 keer verdund in kweekmedium (werkoplossingen). De uiteindelijke concentratie in de plaat mag niet hoger zijn dan 1 000 µg/ml, zelfs als deze concentratie niet-toxisch is.

De werkoplossingen worden tot slot gebruikt voor blootstelling, door een gelijke hoeveelheid werkoplossing toe te voegen aan de hoeveelheid THP-1-celsuspensie in de plaat (zie ook punt 17) om op die manier opnieuw een tweevoudige verdunning te verkrijgen (het uiteindelijke concentratiebereik in de plaat is doorgaans 7,81–1 000 µg/ml).

16. De oplosmiddel-/vehiculumcontrole die in de h-CLAT-methode wordt gebruikt, is kweekmedium (voor teststoffen die hetzij met medium, hetzij met een zoutoplossing opgelost of stabiel gedispergeerd zijn (zie punt 4)) of DMSO (voor teststoffen die opgelost of stabiel gedispergeerd zijn in DMSO). Deze controle wordt getest in één enkele uiteindelijke concentratie in de plaat van 0,2 %. De verdunning die in punt 15 voor de werkoplossingen wordt beschreven, wordt ook op de controle toegepast.

Het aanbrengen van de test- en controlestoffen

17. Het kweekmedium of de werkoplossingen die in de punten 15 en 16 worden beschreven, worden in een verhouding van 1:1 (v/v) gemengd met de celsuspensies die zijn geprepareerd in de 24- of 96-putjesplaat met vlakke bodem (zie punt 12). De behandelde platen worden vervolgens gedurende $24 \pm 0,5$ uur geïncubeerd bij 37 °C met 5 % CO₂. Voorkomen moet worden dat vluchtige teststoffen verdampen en dat er kruisbesmetting met teststoffen tussen putjes optreedt, bijvoorbeeld door de plaat voorafgaand aan de incubatie met de teststoffen af te sluiten (20).

Propidiumjodidekleuring (PI-kleuring)

18. Na $24 \pm 0,5$ uur blootstelling worden de cellen overgebracht naar monsterbuisjes en verzameld door centrifugatie. Het supernatans wordt verwijderd en de resterende cellen worden geresuspendeerd met 200 µl (96-putjesplaat) of 600 µl (24-putjesplaat) van een fosfaatgebufferde zoutoplossing met 0,1 % runderserumalbumine (kleuringsbuffer). 200 µl van de celsuspensie wordt overgebracht naar een 96-putjesplaat met ronde bodem (als er een 96-putjesplaat is gebruikt) of microbuisje (als er een 24-putjesplaat is gebruikt) en tweemaal gewassen met 200 µl (96-putjesplaat) of 600 µl (24-putjesplaat) kleuringsbuffer. Tot slot worden de cellen geresuspendeerd in kleuringsbuffer (bv. 400 µl) en er wordt PI-oplossing (bv. 20 µl) toegevoegd (de uiteindelijke concentratie PI is bijvoorbeeld

0,625 µg/ml). Andere cytotoxiciteitsmarkers, zoals 7-aminoactinomycine D (7-AAD) of trypaanblauw, mogen worden gebruikt als de alternatieve kleurstoffen aantoonbaar vergelijkbare resultaten opleveren als PI, bijvoorbeeld door de stoffen voor bekwaamheidstoetsing in aanhangsel 1.2 te testen.

Cytotoxiciteitsmeting met behulp van flowcytometrie en bepaling van de CV75-waarde

19. De PI-opname wordt geanalyseerd met behulp van flowcytometrie waarbij het acquisitiekanaal FL-3 wordt gebruikt. In totaal worden er 10 000 levende cellen (PI-negatief) verzameld. De cellevensvatbaarheid kan worden berekend door in het cytometeranalyseprogramma de onderstaande vergelijking te gebruiken. Wanneer de cellevensvatbaarheid laag is, moeten er maximaal 30 000 cellen, met inbegrip van dode cellen, worden verzameld. Een andere mogelijkheid is dat gedurende één minuut na de start van de analyse gegevens worden verzameld.

$$\text{Cellevensvatbaarheid} = \frac{\text{Aantal levende cellen}}{\text{Totaal aantal verzamelde cellen}} \times 100$$

De CV75-waarde (zie punt 13), dat wil zeggen een concentratie waarbij 75 % van de THP-1-cellen overleeft (25 % cytotoxiciteit), wordt berekend door middel van loglineaire interpolatie aan de hand van de volgende vergelijking:

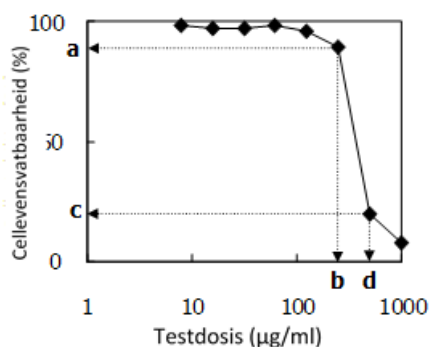
$$\text{Log CV75} = \frac{(75-c) \times \text{Log}(b) - (75-a) \times \text{Log}(d)}{a-c}$$

waarbij:

a de minimumwaarde is van cellevensvatbaarheid hoger dan 75 %

c de maximumwaarde is van cellevensvatbaarheid lager dan 75 %

b en d de concentraties zijn die de waarde van respectievelijk cellevensvatbaarheid a en c vertonen



Er mogen andere methoden worden gebruikt om de CV75 af te leiden, zolang wordt aangetoond dat dit niet van invloed is op de resultaten (bv. door de stoffen voor bekwaamheidstoetsing te testen).

Meting van de CD86/CD54-expressie

Bereiding van de test- en controlestoffen

20. Er wordt een oplosmiddel/vehiculum gebruikt (zoutoplossing, medium of DMSO; zie punt 14) dat geschikt is om de teststoffen op te lossen of stabiel te dispergeren. De teststoffen worden eerst verdund tot de concentratie die overeenkomt met 100 maal (voor zoutoplossing of medium) of 500 maal (voor DMSO) de $1,2 \times \text{CV75}$ die is vastgesteld in de *dosisbepalingstest* (zie punt 19). Als de CV75 niet kan worden bepaald (dat wil zeggen, als er geen voldoende cytotoxiciteit wordt waargenomen in de dosisbepalingstest), moet de hoogste opgeloste of stabiel gedispergeerde concentratie van de teststoffen die met elk oplosmiddel/vehiculum zijn geprepareerd, worden gebruikt als startconcentratie. NB: de uiteindelijke concentratie in de plaat mag niet hoger zijn dan 5 000 µg/ml (in het geval van een zoutoplossing of medium) of 1 000 µg/ml (in het geval van DMSO). Vervolgens worden met het overeenstemmende oplosmiddel/vehiculum 1,2-voudige seriële verdunningen gemaakt om de stamoplossingen te verkrijgen (acht concentraties variërend van $100 \times 1,2 \times \text{CV75}$ tot $100 \times 0,335 \times \text{CV75}$ (zoutoplossing of medium) of van $500 \times 1,2 \times \text{CV75}$ tot $500 \times 0,335 \times \text{CV75}$ (DMSO)) die zullen worden getest aan de hand van de h-CLAT-methode (zie DB-ALM-protocol nr. 158 voor een voorbeeld van een doseringsschema). De stamoplossingen worden vervolgens verder verdund – 50 maal (voor zoutoplossing of medium) of 250 maal (voor DMSO) – in het kweekmedium (werkoplossingen). Deze werkoplossingen worden ten slotte gebruikt voor blootstelling met nog eens een laatste tweevoudige verdunningsfactor in de plaat. Als de resultaten niet voldoen aan de aanvaardbaarheidscriteria die in de punten 29 en 30 met betrekking tot de cellevensvatbaarheid worden beschreven, kan de *dosisbepalingstest* worden herhaald om een nauwkeuriger CV75 vast te stellen. NB: voor de meting van de CD86/CD54-expressie mogen uitsluitend 24-putjesplaten worden gebruikt.
21. De oplosmiddel-/vehiculumcontrole wordt bereid zoals beschreven in punt 16. De positieve controle die in de h-CLAT-methode wordt gebruikt, is DNCB (zie punt 11). De stamoplossingen daarvoor worden bereid in DMSO en verdund zoals beschreven voor de stamoplossingen in punt 20. DNCB moet worden gebruikt als de positieve controle voor de *meting van de CD86/CD54-expressie* met één enkele eindconcentratie in de plaat (doorgaans 4,0 µg/ml). Voor een concentratie van 4,0 µg/ml DNCB in de plaat wordt 2 mg/ml stamoplossing van DNCB in DMSO bereid, die weer 250 maal wordt verdund met kweekmedium tot een werkoplossing van 8 µg/ml. Een andere optie is de CV75 van DNCB, die in elke testinstelling wordt bepaald, te gebruiken als positievecontroleconcentratie. Er kunnen andere geschikte positieve controles worden gebruikt als er historische gegevens beschikbaar zijn om vergelijkbare aanvaardbaarheidscriteria voor de testrun experimenten af te leiden. Voor positieve controles mag de uiteindelijke, enkele concentratie in de plaat niet hoger zijn dan

5 000 µg/ml (in het geval van een zoutoplossing of medium) of 1 000 µg/ml (in het geval van DMSO). De aanvaardbaarheidscriteria voor de testrun zijn dezelfde als beschreven voor de teststof (zie punt 29), behalve het laatste aanvaardbaarheids criterium, aangezien de positieve controle wordt getest bij één enkele concentratie.

Het aanbrengen van de test- en controlestoffen

22. Voor elke teststof en controlestof is één experiment nodig om een voorspelling te kunnen doen. Elk experiment bestaat uit ten minste twee onafhankelijke testruns voor het *meten van de CD86/CD54-expressie* (zie punten 26-28). Elke onafhankelijke testrun wordt uitgevoerd op een andere dag of op dezelfde dag mits voor elke testrun: a) afzonderlijke, verse stamoplossingen en werkoplossingen van de teststof en antilichaamoplossingen worden bereid en b) afzonderlijk geoogste cellen worden gebruikt (d.w.z. de cellen worden verzameld uit verschillende kweekflessen); de cellen kunnen echter wel uit dezelfde passage komen. Teststoffen en controlestoffen die zijn bereid als werkoplossingen (500 µl) worden met 500 µl gesuspenderde cellen (1×10^6 cellen) gemengd in een verhouding van 1:1 en de cellen worden gedurende $24 \pm 0,5$ uur geïncubeerd zoals beschreven in de punten 20 en 21. In elke testrun volstaat één enkele duplo voor elke concentratie van de teststof en controlestof, omdat een voorspelling wordt verkregen op basis van ten minste twee onafhankelijke testruns.

Celkleuring en -analyse

23. Na een blootstelling van $24 \pm 0,5$ uur worden de cellen van de 24-putjesplaat overgebracht naar monsterbuisjes, verzameld door middel van centrifugatie en vervolgens tweemaal gewassen met 1 ml kleuringsbuffer (zo nodig kunnen de cellen vaker worden gewassen). Na het wassen worden de cellen geblokkeerd met 600 µl blokkeeroplossing (kleuringsbuffer die 0,01 % (w/v) globuline bevat (Cohn-fractie II, III, humaan; SIGMA, nr. G2388-10G of equivalent)) en gedurende 15 minuten geïncubeerd bij 4 °C. Na het blokkeren worden de cellen in drie aliquots van 180 µl verdeeld over een 96-putjesplaat met ronde bodem of microbuisjes.
24. Na het centrifugeren worden de cellen gedurende 30 minuten bij 4 °C gekleurd met 50 µl met FITC gelabelde anti-CD86-, anti-CD54- of murien IgG1 (isotype)-antilichamen. De antilichamen, die worden beschreven in h-CLAT DB-ALM-protocol nr. 158 (18), moeten worden verdund met kleuringsbuffer in een verhouding van 3:25 v/v (voor CD86 (BD-PharMingen, nr. 555657; kloon: Fun-1)) of 3:50 v/v (voor CD54 (DAKO, nr. F7143; kloon: 6.5B5) en IgG1 (DAKO, nr. X0927)). Deze antilichaamverduunningsfactoren zijn door de ontwikkelaars van de test aangemerkt als de factoren die de beste signaal-ruisverhouding geven. De ervaring van de testontwikkelaars leert dat de fluorescentie-intensiteit van de antilichamen gewoonlijk consistent is tussen verschillende partijen. Gebruikers kunnen echter overwegen de antilichamen in de omstandigheden van hun eigen

laboratorium te titreren om de beste gebruikconcentraties vast te stellen. Andere met fluorochroom gelabelde anti-CD86- en/of anti-CD54-antilichamen kunnen worden gebruikt als zij aantoonbaar – bijvoorbeeld door de stoffen voor bekwaamheidstoetsing in aanhangsel 1.2 te testen – vergelijkbare resultaten opleveren als met FITC geconjugeerde antilichamen. NB: wijziging van de klonen of leveranciers van de antilichamen die in h-CLAT DB-ALM-protocol nr. 158 (18) worden vermeld, kan de resultaten beïnvloeden. Nadat de cellen tweemaal of vaker zijn gewassen met 150 µl kleuringsbuffer, worden ze geresuspendeerd in kleuringsbuffer (bv. 400 µl), en wordt de PI-oplossing (bv. 20 µl om een uiteindelijke concentratie te verkrijgen van 0,625 µg/ml) of een oplossing van een andere cytotoxiciteitsmarker (zie punt 18) toegevoegd. De expressieniveaus van CD86 en CD54 en de cellevensvatbaarheid worden geanalyseerd met behulp van flowcytometrie.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Evaluatie van de gegevens

25. De expressie van CD86 en CD54 wordt geanalyseerd met behulp van flowcytometrie, waarbij het acquisitiekanaal FL-1 wordt gebruikt. Op grond van de geometrisch gemiddelde fluorescentie-intensiteit (MFI) wordt de relatieve fluorescentie-intensiteit (RFI) van CD86 en CD54 voor positievecontrolecellen (ctrl) en met de chemische stof behandelde cellen berekend aan de hand van de volgende vergelijking:

$$RFI = \frac{MFI \text{ van met de chemische stof behandelde cel} - MFI \text{ van met de chemische stof behandelde isotypecontrolecellen}}{MFI \text{ van de met oplosmiddel/vehiculum behandelde ctrl-cellen} - MFI \text{ van de met oplosmiddel/vehiculum behandelde isotype-ctrl-cellen}} \times 100$$

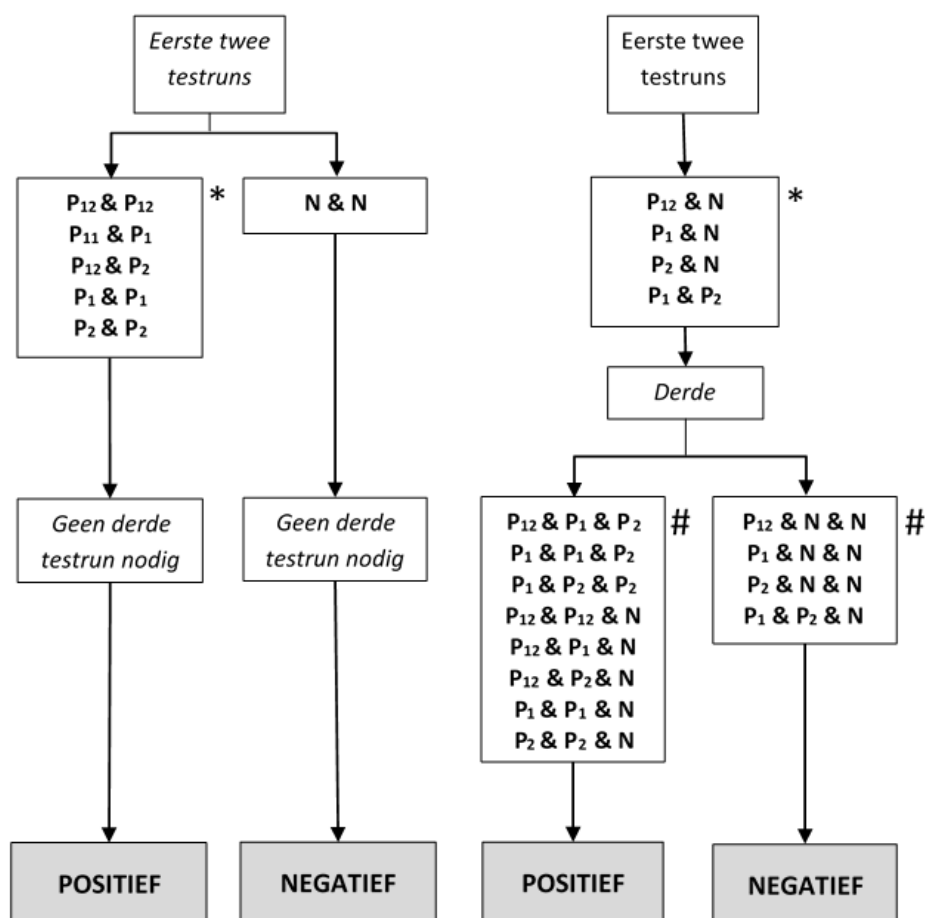
De cellevensvatbaarheid van de isotypecontrolecellen (ctrl), die gekleurd zijn met muriene IgG1 (isotype)-antilichamen, wordt eveneens berekend aan de hand van de vergelijking in punt 19.

Voorspellingsmodel

26. Voor de meting van de CD86/CD54-expressie wordt elke teststof in ten minste twee onafhankelijke testruns getest om één enkele voorspelling af te leiden (POSITIEF of NEGATIEF). Een h-CLAT-voorspelling wordt POSITIEF geacht als aan ten minste één van de volgende voorwaarden is voldaan in twee van de twee of in ten minste twee van de drie onafhankelijke testruns. Is dat niet het geval, dan wordt de h-CLAT-voorspelling NEGATIEF geacht (figuur 1):
- De RFI van CD86 is gelijk aan of groter dan 150 % bij elke willekeurige geteste concentratie (met een cellevensvatbaarheid ≥ 50 %);
 - De RFI van CD54 is gelijk aan of groter dan 200 % bij elke willekeurige geteste concentratie (met een cellevensvatbaarheid ≥ 50 %).

27. Op basis van het bovenstaande wordt de h-CLAT-voorspelling POSITIEF geacht als de eerste twee testruns beide positief zijn voor CD86 en/of beide positief zijn voor CD54. In dat geval hoeft geen derde testrun te worden uitgevoerd. Als de eerste twee testruns voor beide markers negatief zijn, wordt de h-CLAT-voorspelling NEGATIEF geacht (waarbij rekening wordt gehouden met het bepaalde in punt 30), zonder dat een derde testrun hoeft te worden uitgevoerd. Als de eerste twee testruns echter voor ten minste één van beide markers (CD54 of CD86) niet overeenstemmen, is een derde testrun nodig en wordt de uiteindelijke voorspelling gebaseerd op de meerderheidsuitslag van de drie afzonderlijke testruns (d.w.z. twee van de drie). In dit verband moet worden opgemerkt dat als twee onafhankelijke testruns worden uitgevoerd en de ene is alleen positief voor CD86 (hierna P_1 genoemd) en de andere is alleen positief voor CD54 (hierna P_2 genoemd), een derde testrun vereist is. Als deze derde testrun negatief is voor beide markers (hierna N genoemd) wordt de h-CLAT-voorspelling NEGATIEF geacht. Anderzijds wordt de h-CLAT-voorspelling POSITIEF geacht als de derde testrun positief is voor een van beide markers (P_1 of P_2) of voor beide markers (hierna P_{12} genoemd).

Figuur 1: Voorspellingsmodel dat wordt gebruikt in de h-CLAT-methode. Een h-CLAT-voorspelling dient te worden bekeken in het kader van een IATA en in overeenstemming met hetgeen is bepaald in de punten 7 en 8 in de algemene inleiding.



P₁: testrun alleen positief voor CD86; P₂: testrun alleen positief voor CD54; P₁₂: testrun positief voor zowel CD86 als CD54; N: testrun noch positief voor CD86, noch voor CD54.

* De vakken tonen de relevante combinaties van resultaten van de eerste twee testruns, onafhankelijk van de volgorde waarin ze worden verkregen.

De vakken tonen de relevante combinaties van resultaten van de drie testruns op basis van de resultaten in de eerste twee testruns die in het bovenstaande vak worden getoond, maar geven niet de volgorde weer waarin ze zijn verkregen.

28. Voor teststoffen waarvan de h-CLAT voorspelt dat ze POSITIEF zijn, kan eventueel de waarde van twee Effectieve Concentraties (EC's) worden bepaald – de EC150 voor CD86 en de EC200 voor CD54 – d.w.z. de concentratie waarbij de teststoffen een RFI van 150 of 200 opleverden. Deze EC-waarden zouden mogelijk ook kunnen bijdragen aan de beoordeling van de sensibiliserende potentie (9), wanneer zij worden gebruikt in het kader van een geïntegreerde aanpak zoals een IATA (4) (5) (6) (7) (8). Ze kunnen worden berekend aan de hand van de volgende vergelijkingen:

$$EC150 \text{ (voor CD86)} = B_{conc} + [(150 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC200 \text{ (voor CD54)} = B_{conc} + [(200 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

waarbij:

A_{conc} de laagste concentratie is in $\mu\text{g/ml}$ met een RFI > 150 (CD86) of 200 (CD54)

B_{conc} de hoogste concentratie is in $\mu\text{g/ml}$ met een RFI < 150 (CD86) of 200 (CD54)

A_{RFI} de RFI is bij de laagste concentratie met een RFI > 150 (CD86) of 200 (CD54)

B_{RFI} de RFI is bij de hoogste concentratie met een RFI < 150 (CD86) of 200 (CD54)

Om de waarden van de EC150 en EC200 nauwkeuriger af te leiden, kan het nodig zijn drie onafhankelijke testruns uit te voeren voor de *meting van de CD86/CD54-expressie*. De uiteindelijke EC150- en EC200-waarden worden vervolgens bepaald als de mediane waarde van de EC's die zijn berekend uit de drie onafhankelijke testruns. Wanneer slechts twee van de drie onafhankelijke testruns aan de criteria voor positiviteit voldoen (zie punten 26-27), wordt de hoogste EC150 of EC200 van de twee berekende waarden genomen.

Aanvaardbaarheidscriteria

29. Bij gebruik van de h-CLAT-methode moet aan de volgende aanvaardbaarheidscriteria worden voldaan (22) (27).
 - De cellevensvatbaarheid van controles met medium en oplosmiddel/vehiculum moet groter zijn dan 90 %.
 - In de oplosmiddel-/vehiculumcontrole mogen de RFI-waarden van zowel CD86 als CD54 niet hoger zijn dan de positieve criteria (CD86 RFI $\geq$ 150 % en CD54 RFI $\geq$ 200 %). De RFI-waarden van de oplosmiddel-/vehiculumcontrole worden berekend aan de hand van de formule in punt 25 ("MFI van chemische stof" moet worden vervangen door "MFI van oplosmiddel/vehiculum" en "MFI van oplosmiddel/vehiculum" moet worden vervangen door "MFI van (medium)controle").
 - Voor zowel medium- als oplosmiddel-/vehiculumcontroles moet de verhouding van de MFI tot de isotypecontrole voor zowel CD86 als CD54 groter zijn dan 105 %.
 - In de positieve controle (DNCB) moeten de RFI-waarden van zowel CD86 als CD54 voldoen aan de positieve criteria (CD86 RFI $\geq$ 150 en CD54 RFI $\geq$ 200) en moet de cellevensvatbaarheid groter zijn dan 50 %.
 - De cellevensvatbaarheid van de teststof moet in ten minste vier geteste concentraties in elke testrun groter zijn dan 50 %.
30. Negatieve resultaten zijn uitsluitend aanvaardbaar voor teststoffen die bij de hoogste geteste concentratie (d.w.z. $1,2 \times \text{CV75}$ volgens het seriële verdunningsschema dat in punt 20 wordt beschreven) een cellevensvatbaarheid laten zien van minder dan 90 %. Als de cellevensvatbaarheid bij $1,2 \times \text{CV75}$ 90 % of hoger is, moet het negatieve resultaat

worden weggelaten. In dat geval wordt aanbevolen te proberen de keuze van de dosis te verfijnen door de CV75-bepaling te herhalen. Opgemerkt moet worden dat een negatief resultaat aanvaardbaar is, zelfs als de cellevensvatbaarheid hoger is dan 90 %, wanneer 5 000 µg/ml in een zoutoplossing (of medium of andere oplosmiddelen/vehicula), 1 000 µg/ml in DMSO of de hoogste oplosbare concentratie wordt gebruikt als de maximale testconcentratie van een teststof.

Testverslag

31. 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-nummer(s), SMILES- of InChI-code(s), structuurformules en/of andere identificatiemiddelen;
- fysisch voorkomen, log Kow, oplosbaarheid in water, oplosbaarheid in DMSO, molecuulgewicht en andere relevante fysisch-chemische eigenschappen, voor zover die beschikbaar zijn;
- zuiverheid, chemische naam van onzuiverheden waar passend en praktisch haalbaar enz.;
- behandeling voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);
- geteste concentratie(s);
- opslagomstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar;
- motivering van de keuze van het oplosmiddel/vehiculum voor elke teststof.

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;
- fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water, oplosbaarheid in DMSO en andere relevante fysisch-chemische eigenschappen, voor zover die beschikbaar zijn;
- molecuulgewicht of schijnbaar molecuulgewicht in het geval van mengsels/polymeren waarvan de samenstelling bekend is, of andere informatie die relevant is voor het verloop van de studie;
- behandeling voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);
- geteste concentratie(s);

- opslagomstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar;
- motivering van de keuze van het oplosmiddel/vehiculum voor elke teststof.

Controles

Positieve controle

- chemische identificatie, zoals IUPAC- of CAS-na(a)m(en), CAS-nummer(s), SMILES- of InChI-code(s), structuurformules en/of andere identificatiemiddelen;
- fysisch voorkomen, log Kow, oplosbaarheid in water, oplosbaarheid in DMSO, molecuulgewicht en andere relevante fysisch-chemische eigenschappen, voor zover die beschikbaar zijn en voor zover van toepassing;
- zuiverheid, chemische naam van onzuiverheden waar passend en praktisch haalbaar enz.;
- behandeling voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);
- geteste concentratie(s);
- opslagomstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar;
- verwijzing naar historische positievecontrolesresultaten waaruit de geschiktheid van de aanvaardbaarheidscriteria voor de testrun blijkt, indien van toepassing.

Negatieve controle en oplosmiddel-/vehiculumcontrole

- chemische identificatie, zoals IUPAC- of CAS-na(a)m(en), CAS-nummer(s), SMILES- of InChI-code(s), structuurformules en/of andere identificatiemiddelen;
- zuiverheid, chemische naam van onzuiverheden waar passend en praktisch haalbaar enz.;
- fysisch voorkomen, molecuulgewicht en andere relevante fysisch-chemische eigenschappen, in het geval er andere controle-oplosmiddelen/-vehicula worden gebruikt dan diegene die worden vermeld in de testrichtlijn, en voor zover beschikbaar;
- opslagomstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar;
- motivering van de keuze van het oplosmiddel/vehiculum voor elke teststof.

Testomstandigheden

- naam en adres van de opdrachtgever, testinstallatie en de onderzoeksleider;
- beschrijving van de gebruikte methode;
- gebruikte cellijn, omstandigheden waarin die werd bewaard en oorsprong (bv. de instelling waarvan de cellijn werd verkregen);

- gebruikte flowcytometrie (bv. model), met inbegrip van de gebruikte instrumentinstellingen, globuline, antilichamen en cytotoxiciteitsmarker;
- de procedure die gebruikt is om aan te tonen dat het laboratorium bekwaam is om de test uit te voeren, door de stoffen voor bekwaamheidstoetsing te testen, en de procedure die gebruikt is om aan te tonen dat de resultaten van de test in de loop van de tijd kunnen worden gereproduceerd, bv. controlegegevens uit het verleden en/of gegevens van reactiviteitscontroles uit het verleden.

Aanvaardbaarheidscriteria voor de test

- cellevensvatbaarheid, MFI- en RFI-waarden die met de oplosmiddel-/vehiculumcontrole zijn verkregen in vergelijking met het aanvaardbaarheidsbereik;
- cellevensvatbaarheid en RFI-waarden die met de positieve controle zijn verkregen in vergelijking met het aanvaardbaarheidsbereik;
- cellevensvatbaarheid van alle geteste concentraties van de teststof.

Werkwijze

- aantal gebruikte testruns;
- de gehanteerde concentraties van de teststof, toedienings- en blootstellingstijd (indien verschillend van de aanbevolen tijd);
- blootstellingsduur (indien verschillend van de aanbevolen tijd);
- een beschrijving van de gebruikte beoordelings- en beslissingscriteria;
- een beschrijving van eventuele modificaties van de testprocedure.

Resultaten

- tabel van de gegevens, waaronder CV75 (indien van toepassing), afzonderlijke geometrische MFI, RFI, cellevensvatbaarheidswaarden, EC150-/EC200-waarden (indien van toepassing) die zijn verkregen voor de teststof en voor de positieve controle in elke testrun, en een indicatie van de score van de teststof volgens het voorspellingsmodel;
- een beschrijving van eventuele andere relevante waarnemingen.

Bespreking van de resultaten

- bespreking van de resultaten verkregen met de h-CLAT-methode;
- overweging van de testresultaten in de context van een IATA, als er andere relevante informatie beschikbaar is.

Conclusies

LITERATUUR

- (1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, 767–773.
- (2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro* 21, 428-437.
- (3) EC EURL CEVMA (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Beschikbaar op: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, 1318-1332.
- (5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol.* 35, 1333-1347.
- (6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol.* 63, 489-504.
- (7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69, 371-379.
- (8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71, 337-351.

- (9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol.* 89, 2355-2383.
- (10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol.* DOI 10.1002/jat.3281.
- (11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150-60.
- (12) EC EURL CEVMA (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Beschikbaar op: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>
- (13) EC EURL CEVMA (2012). Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report. Beschikbaar op: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38, 599-609.
- (15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- (16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch Toxicol* 87, 1683-1699.
- (17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for

- evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.
- (18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Beschikbaar op: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamoto K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.
- (20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.
- (21) OESO (2005). Guidance Document No 34 on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Series on Testing and Assessment. Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs, Frankrijk, 2005, 96 pp.
- (22) OESO (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Beschikbaar op: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- (23) Verenigde Naties (VN) (2013). Mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen (GHS). Vijfde herziene editie. 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
- (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).
- (25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

Aanhangsel 1.1

DEFINITIES

AOP (Adverse Outcome Pathway): een reeks gebeurtenissen van de chemische structuur van een doelstof of een groep soortgelijke chemische stoffen, van de moleculaire inleidende gebeurtenis tot een te onderzoeken in-vivoresultaat (22).

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een test, 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 (21).

Chemische stof: een stof of een mengsel.

CV75: de geschatte concentratie waarbij de cellevensvatbaarheid 75 % is.

EC150: de concentraties waarbij sprake is van de RFI-waarde 150 voor CD86-expressie.

EC200: de concentraties waarbij sprake is van de RFI-waarde 200 voor CD54-expressie.

Flowcytometrie: een cytometrische techniek waarbij in een vloeistof gesuspendeerde cellen één voor één door een brandpunt van exciterend licht stromen, dat wordt verstrooid in patronen die kenmerkend zijn voor de cellen en hun bestanddelen; de cellen worden vaak gelabeld met fluorescente markers, zodat het licht eerst wordt geabsorbeerd en vervolgens met gewijzigde frequenties wordt uitgezonden.

Geldige test: een test 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 (21).

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. Het is een maat voor de nauwkeurigheid van een test die categorale resultaten oplevert, en is een belangrijke overweging bij de beoordeling van de relevantie van een test (21).

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,

gevaarenaanduidingen, 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 (23).

IATA (Integrated Approach on Testing and Assessment, geïntegreerde test- en beoordelingsbenadering): een gestructureerde aanpak die wordt gebruikt voor de identificatie van gevaren (potentieel), het kenmerken van gevaren (potentie) en/of het beoordelen van de veiligheid (potentieel/potentie en blootstelling) van een chemische stof of een groep chemische stoffen, waarbinnen alle relevante gegevens strategisch worden geïntegreerd en worden afgewogen als inbreng voor regelgevingsbesluiten inzake potentiële gevaren en/of risico's en/of de noodzaak van verdere gerichte en bijgevolg minimale tests.

Kleuringsbuffer: Een fosfaatgebufferde zoutoplossing met 0,1 % runderserumalbumine.

Mediumcontrole: een onbehandeld monster dat alle componenten bevat van een testsysteem. Dit monster wordt tezamen 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.

Nauwkeurigheid: de mate van overeenstemming tussen testresultaten en erkende referentiewaarden. Het is een maat voor de prestaties van de test en één aspect van relevantie. Deze term en de term "concordantie", waaronder het percentage correcte uitkomsten van een test wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt (21).

Oplosmiddel-/vehiculumcontrole: een onbehandeld monster dat alle componenten bevat van een testsysteem met uitzondering van de teststof, maar met inbegrip van het gebruikte oplosmiddel/vehiculum. Dit monster wordt gebruikt om de referentierespons vast te stellen voor de monsters die worden behandeld met de in hetzelfde oplosmiddel/vehiculum opgeloste of stabiel gedispergeerde teststof. Als dit monster getest wordt met een tegelijkertijd gemeten mediumcontrole, toont het ook aan of het oplosmiddel/vehiculum met het testsysteem interageert.

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 positieve controlerespons in de loop van de tijd kan worden beoordeeld, mag de grootte van de positieve respons niet buitensporig zijn.

Prehaptenen: chemische stoffen die in sensibiliserende stoffen veranderen na abiotische transformatie.

Prohaptenen: chemische stoffen die enzymatische activering nodig hebben om hun potentieel voor huidsensibilisatie te realiseren.

Relatieve fluorescentie-intensiteit (RFI): Relatieve waarden van de geometrisch gemiddelde fluorescentie-intensiteit (MFI) in de met de chemische stof behandelde cellen vergeleken met de MFI in de met oplosmiddel/vehiculum behandelde cellen.

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 test (21).

Specificiteit: het percentage van alle negatieve/niet-actieve chemische stoffen dat door middel van de testmethode correct wordt ingedeeld. Het is een maat voor de nauwkeurigheid van een test die categorale resultaten oplevert en is een belangrijke overweging bij de beoordeling van de relevantie van een test (21).

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 het gelijktijdig testen van een of meer chemische stoffen met een oplosmiddel-/vehiculumcontrole en met een positieve controle.

Teststof: alle volgens deze methode geteste stoffen of mengsels.

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

Aanhangsel 1.2

STOFFEN VOOR BEKWAAMHEIDSTOETSING

Vooraleer over te gaan tot routinegebruik van de onder testmethode B.71 vallende test die in dit aanhangsel wordt beschreven, moeten laboratoria hun technische bekwaamheid aantonen door op de juiste wijze de verwachte h-CLAT-voorspelling te verkrijgen voor de 10 stoffen die in tabel 1 worden aanbevolen, en door de CV75-, EC150- en EC200-waarden te verkrijgen die binnen de respectieve referentiebereiken vallen voor ten minste 8 van de 10 stoffen voor bekwaamheidstoetsing. De stoffen voor bekwaamheidstoetsing zijn zodanig geselecteerd dat ze alle mogelijke responsen voor huidsensibilisatiegevaar weerspiegelen. Andere selectiecriteria waren dat stoffen in de handel beschikbaar zijn, en dat er in-vivoreferentiegegevens en met de h-CLAT-methode gegenereerde in-vitrogegevens van zeer goede kwaliteit beschikbaar zijn. Voor de h-CLAT-methode zijn tevens gepubliceerde referentiegegevens beschikbaar (3) (14).

Tabel 1: Aanbevolen stoffen voor het aantonen van technische bekwaamheid met de h-CLAT-methode

Stoffen voor bekwaamheidstoetsing	CAS RN	Fysische toestand	In-vivovoorspelling ¹	CV75 Referentie-bereik in µg/ml ²	h-CLAT-resultaten voor CD86 (EC150-referentie-bereik in g/ml) ²	h-CLAT-resultaten voor CD54 (EC200-referentie-bereik in g/ml) ²
2,4-Dinitrochlorbenzeen	97-00-7	Vaste stof	Sensibiliserend (extreem)	2-12	Positief (0,5-10)	Positief (0,5-15)
4-Fenyleendiamine	106-50-3	Vaste stof	Sensibiliserend (sterk)	5-95	Positief (< 40)	Negatief (> 1,5) ³
Nikkelsulfaat	10101-97-0	Vaste stof	Sensibiliserend (matig)	30-500	Positief (< 100)	Positief (10-100)
2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	Vaste stof	Sensibiliserend (matig)	30-400	Negatief (> 10) ³	Positief (10-140)
R(+)-Limonen	5989-27-5	Vloeistof	Sensibiliserend (zwak)	> 20	Negatief (> 5) ³	Positief (< 250)
Imidazolidinylureum	39236-46-9	Vaste stof	Sensibiliserend (zwak)	25-100	Positief (20-90)	Positief (20-75)
Propaan-2-ol	67-63-0	Vloeistof	Niet-sensibiliserend	> 5 000	Negatief (> 5 000)	Negatief (> 5 000)
Glycerol	56-81-5	Vloeistof	Niet-sensibiliserend	> 5 000	Negatief (> 5 000)	Negatief (> 5 000)
Melkzuur	50-21-5	Vloeistof	Niet-sensibiliserend	1 500-5 000	Negatief (> 5 000)	Negatief (> 5 000)
4-Aminobenzoëzuur	150-13-0	Vaste stof	Niet-sensibiliserend	> 1 000	Negatief (> 1 000)	Negatief (> 1 000)

Afkortingen: CAS RN = registratienummer van de Chemical Abstracts Service

¹ De in-vivo-gevoeren- en potentievoorspelling is gebaseerd op LLKT-gegevens (3) (14). De in-vivopotentie wordt afgeleid met behulp van de criteria die zijn voorgesteld door ECETOC (24).

² Op basis van in het verleden waargenomen waarden (13) (25).

³ In het verleden zijn voor deze marker overwegend negatieve resultaten verkregen en bijgevolg ligt een negatief resultaat het meest in de lijn der verwachting. Het gegeven bereik is vastgesteld op basis van de weinige positieve resultaten die in het verleden

zijn waargenomen. Als er een positief resultaat wordt verkregen, moet de EC-waarde binnen het vermelde referentiebereik liggen.

Aanhangsel 2

IN-VITROHUIDSENSIBILISATIE: U937-CELLIJNACTIVERINGSTEST (U-SENS™)

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

1. De U-SENS™-test kwantificeert de verandering in de expressie van een marker op het celoppervlak die gepaard gaat met de activering van monocyt en dendritische cellen (d.w.z. CD86), in de humane histiocytairlymfoomcellijn U937, na blootstelling aan sensibiliserende stoffen (1). De gemeten expressieniveaus van celoppervlaktemarker CD86 in de cellijn U937 wordt vervolgens gebruikt om het onderscheid tussen huidsensibiliserende stoffen en niet-sensibiliserende stoffen te staven.
2. De U-SENS™-test is geëvalueerd in een valideringsstudie (2) die werd gecoördineerd door L'Oréal en in een latere onafhankelijke beoordeling door vakgenoten van het Raadgevend wetenschappelijk comité (ESAC) van het referentielaboratorium voor alternatieven voor dierproeven van de Europese Unie (EURL CEVMA) (3). Op grond van al het beschikbare bewijsmateriaal en de inbreng van regelgevers en belanghebbenden werd de U-SENS™ door het EURL CEVMA (4) aanbevolen voor gebruik in het kader van een IATA om het onderscheid tussen huidsensibiliserende stoffen en niet-sensibiliserende stoffen te staven met het oog op de gevarenindeling en etikettering. In zijn leidraad inzake de rapportage van gestructureerde benaderingen van gegevensintegratie en afzonderlijke informatiebronnen die in het kader van een IATA voor huidsensibilisatie worden gebruikt, bespreekt de OESO momenteel een aantal casestudy's waarin verschillende teststrategieën en voorspellingsmodellen worden beschreven. Een van de verschillende vastgestelde benaderingen is gebaseerd op de U-SENS™-bepaling (5). Ook elders in de literatuur (4) (5) (7) worden voorbeelden genoemd van het gebruik van U-SENS™-gegevens in combinatie met andere informatie, met inbegrip van gegevens uit het verleden en bestaande, geldige gegevens die bij mensen zijn verzameld (6).
3. De U-SENS™-test bleek overdraagbaar te zijn naar laboratoria met ervaring in het kweken van cellen en flowcytometrieanalyse. De verwachte reproduceerbaarheid van voorspellingen op basis van deze test binnen laboratoria en tussen verschillende laboratoria bedraagt respectievelijk 90 % en 84 % (8). De resultaten van het valideringsstudie (8) en andere gepubliceerde studies (1) geven over het algemeen aan dat, in vergelijking met de LLKT-resultaten, de nauwkeurigheid in het onderscheiden van sensibiliserende stoffen (d.w.z. VN-GHS/CLP-categorie 1) van niet-sensibiliserende stoffen 86 % (N=166) bedraagt, met een gevoeligheid van 91 % (118/129) en een specificiteit van 65 % (24/37). In vergelijking met bij mensen verkregen resultaten, bedraagt de nauwkeurigheid in het onderscheiden van sensibiliserende stoffen (d.w.z. VN-GHS/CLP-categorie 1) van niet-

sensibiliserende stoffen 77 % (N=101), met een gevoeligheid van 100 % (58/58) en een specificiteit van 47 % (20/43). Bij de U-SENSTM is, in vergelijking met de LLKT, de kans dat valsnegatieve voorspellingen betrekking hebben op chemische stoffen met een lage tot gemiddelde potentie voor huidsensibilisatie (d.w.z. VN-GHS/CLP-subcategorie 1B) hoger dan dat ze betrekking hebben op chemische stoffen met een hoge potentie voor huidsensibilisatie (d.w.z. VN-GHS/CLP-subcategorie 1A) (1) (8) (9). Gecombineerd geeft deze informatie aan dat de U-SENSTM-test nuttig kan zijn om het gevaar van huidsensibilisatie te bepalen. De waarden die hier worden vermeld voor de nauwkeurigheid van de U-SENSTM als losstaande test vormen echter slechts een indicatie, aangezien de test moet worden bekeken in combinatie met andere informatiebronnen in de context van een IATA en in overeenstemming met hetgeen hierboven bepaald is in de punten 7 en 8 in de algemene inleiding. Bovendien moet bij de beoordeling van methoden zonder dierproeven voor huidsensibilisatie rekening worden gehouden met het feit dat de LLKT en andere dierproeven de situatie van mensen mogelijk niet volledig weerspiegelen.

4. Op basis van de op dit moment beschikbare gegevens is gebleken dat de U-SENSTM-test kan worden toegepast op teststoffen (waaronder cosmetica-ingrediënten, zoals conserveermiddelen, oppervlakteactieve stoffen, andere actieve stoffen, kleurstoffen) die verschillende organische functionele groepen, fysisch-chemische eigenschappen en potenties voor huidsensibilisatie (zoals bepaald in in-vivo-onderzoeken) beslaan, evenals het spectrum van reactiemechanismen waarvan bekend is dat ze samenhangen met huidsensibilisatie (d.w.z. Michael-acceptor, vorming van Schiff-basen, acyloverdracht, nucleofiele bimoleculaire substitutie [SN₂] of nucleofiele aromatische substitutie [SNA_r]) (1) (8) (9) (10). De U-SENSTM-test is van toepassing op teststoffen die oplosbaar zijn of een stabiele dispersie vormen (d.w.z. een colloïde of suspensie waarin de teststof niet bezinkt of zich van het oplosmiddel/vehiculum afscheidt in verschillende fasen) in een geschikt oplosmiddel/vehiculum (zie punt 13). De U-SENSTM voorspelde correct welke chemische stoffen in de gegevensreeks prehaptenen waren (d.w.z. stoffen die door oxidatie worden geactiveerd) en welke chemische stoffen prohaptenen waren (d.w.z. stoffen die enzymactivering nodig hebben, bijvoorbeeld via P450-enzymen) (1) (10). Membraanverstorende stoffen kunnen leiden tot valspositieve resultaten als gevolg van een niet-specifieke stijging van de CD86-expressie: 3 van de 7 valspositieven met betrekking tot de in-vivoreferentieclassificatie waren oppervlakteactieve stoffen (1). Positieve resultaten met oppervlakteactieve stoffen moeten dan ook met terughoudendheid in aanmerking worden genomen, terwijl negatieve resultaten met oppervlakteactieve stoffen nog steeds kunnen worden gebruikt om de identificatie van de teststof als niet-sensibiliserende stof te staven. Fluorescerende teststoffen kunnen worden beoordeeld met de U-SENSTM (1). Sterk fluorescerende teststoffen die op dezelfde golflengte uitzenden als fluoresceïne-isothiocyanaat (FITC) of als propidiumjodide (PI), zullen echter interfereren met de flowcytometrische detectie en kunnen dus niet correct worden beoordeeld wanneer

gebruikgemaakt wordt van met FITC geconjugeerde antilichamen (potentieel valsnegatief) of PI (levensvatbaarheid niet meetbaar). In dat geval kunnen respectievelijk andere met fluorochroom gelabelde antilichamen of andere cytotoxiciteitsmarkers worden gebruikt, zolang kan worden aangetoond dat ze vergelijkbare resultaten opleveren als de met FITC gelabelde antilichamen of PI (zie punt 18), bijvoorbeeld door de stoffen voor bekwaamheidstoetsing in aanhangsel 2.2 te testen. In het licht van het bovenstaande moeten positieve resultaten met oppervlakteactieve stoffen en negatieve resultaten met sterk fluorescerende teststoffen worden geïnterpreteerd in de context van de vermelde beperkingen en samen met andere informatiebronnen in het kader van een IATA. In gevallen waarin kan worden aangetoond dat de U-SENS™-test niet toepasselijk is op andere specifieke categorieën teststoffen, dient de test niet te worden gebruikt voor die specifieke categorieën.

5. Zoals hierboven beschreven, helpt de U-SENS™-test om huidsensibiliserende stoffen te onderscheiden van niet-sensibiliserende stoffen. Deze testmethode kan echter ook bijdragen aan de beoordeling van de sensibiliserende potentie wanneer zij wordt gebruikt in het kader van een geïntegreerde aanpak zoals een IATA. Er moet niettemin nog meer onderzoek worden verricht, bij voorkeur op basis van gegevens die zijn verzameld bij mensen, om te bepalen hoe de resultaten van de U-SENS™ kunnen worden benut bij de beoordeling van de potentie.
6. Definities worden gegeven in aanhangsel 2.1.

PRINCIPE VAN DE TEST

7. De U-SENS™-bepaling is een in-vitrobepaling die veranderingen in de expressie van de celoppervlaktemarker CD86 op een humane histiocytairlymfoomcellijn, U937, kwantificeert nadat de cellen 45 ± 3 uur aan de teststof zijn blootgesteld. De CD86-oppervlaktemarker is één kenmerkende marker van U937-activering. CD86 staat bekend als een co-stimulerend molecuul dat monocytische activatie, die een cruciale rol speelt bij de priming van T-cellen, kan nabootsen. De veranderingen in de expressie van de CD86-celoppervlaktemarker worden gemeten met behulp van flowcytometrie, nadat de cellen zijn gekleurd, doorgaans met antilichamen die zijn gelabeld met fluoresceïne-isothiocyanaat (FITC). Tegelijkertijd wordt een cytotoxiciteitsmeting uitgevoerd (bv. met gebruikmaking van PI) om te beoordelen of bij subcytotoxische concentraties opregulatie van de expressie van de CD86-oppervlaktemarker plaatsvindt. De stimuleringsindex (SI) van de CD86-oppervlaktemarker vergeleken met de oplosmiddel-/vehiculumcontrole wordt berekend en gebruikt in het voorspellingsmodel (zie punt 19) om het onderscheid tussen huidsensibiliserende stoffen en niet-sensibiliserende stoffen te staven.

AANTONING VAN BEKWAAMHEID

8. Vooraleer over te gaan tot routinegebruik van de onder testmethode B.71 vallende test die in dit aanhangsel wordt beschreven, moeten laboratoria hun technische bekwaamheid aantonen met de 10 stoffen voor bekwaamheidstoetsing die in aanhangsel 2.2 worden genoemd, met inachtneming van de OESO-leidraad "Good *in vitro* Method Practices" (11). Gebruikers van de test moeten bovendien een historische gegevensbank bijhouden van de gegevens die het resultaat zijn van de reactiviteitscontroles (zie punt 11), de positieve controles en oplosmiddel-/vehiculumcontroles (zie punten 15-16). Zij moeten deze gegevens gebruiken om te bevestigen dat de reproduceerbaarheid van de test in hun laboratorium in de loop van de tijd gehandhaafd blijft.

PROCEDURE

9. Deze test is gebaseerd op protocol nr. 183 betreffende U-SENS™ van de DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation (DB-ALM) (12). Wanneer de testmethode in een laboratorium wordt toegepast en gebruikt, moeten de standaardwerkwijzen voor de U-SENS™-test worden gevolgd. Er kan een geautomatiseerd systeem worden gebruikt om de U-SENS™-test uit te voeren als dit aantoonbaar – bijvoorbeeld door de stoffen voor bekwaamheidstoetsing in aanhangsel 2.2 te testen – vergelijkbare resultaten oplevert. Hieronder worden de belangrijkste onderdelen en procedures van de U-SENS™-test beschreven.

Celpreparaten

10. Voor het toepassen van de U-SENS™-test moet de humane histiocytairlymfoomcellijn, U937 (13), worden gebruikt. Aanbevolen wordt cellen (kloon CRL1593.2) te betrekken van een goed gekwalificeerde celbank zoals de American Type Culture Collection.
11. U937-cellen worden gekweekt, bij 37 °C in een vochtige atmosfeer met 5 % CO₂, in RPMI-1640-medium, aangevuld met 10 % foetaal runderserum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 eenheden/ml penicilline en 100 µg/ml streptomycine (volledig medium). U937-cellen worden stelselmatig iedere 2-3 dagen gepasseerd met een dichtheid van respectievelijk 1,5 of 3×10^5 cellen/ml. De celdichtheid mag niet hoger zijn dan 2×10^6 cellen/ml en de cellevensvatbaarheid zoals gemeten aan de hand van trypaanblauwuitsluiting moet ≥ 90 % zijn (niet toe te passen tijdens de eerste passage na het ontdooien). Voordat de cellen voor tests worden gebruikt, moet de geschiktheid van elke partij cellen, FBS of antilichamen worden vastgesteld aan de hand van een reactiviteitscontrole. De reactiviteitscontrole van de cellen moet worden uitgevoerd met behulp van de positieve controle picrylsulfonzuur (2,4,6-trinitrobenzeensulfonzuur: TNBS) (CASRN 2508-19-2, zuiverheid ≥ 99 %) en de negatieve controle melkzuur (CASRN 50-21-5, zuiverheid ≥ 85 %), ten minste één week

na het ontgooien. Voor de reactiviteitscontrole moeten voor elk van de twee controles zes uiteindelijke concentraties worden getest (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 µg/ml en melkzuur: 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml). TNBS opgelost in volledig medium moet een positieve en concentratiegerelateerde respons van CD86 opleveren (bijvoorbeeld wanneer een positieve concentratie, $CD86-SI \geq 150$, wordt gevolgd door een concentratie met een hogere CD86-SI) en melkzuur opgelost in volledig medium moet een negatieve respons van CD86 opleveren (zie punt 21). Voor de test mag uitsluitend de partij cellen worden gebruikt die de reactiviteitscontrole tweemaal met goed gevolg heeft doorstaan. Cellen kunnen tot maximaal zeven weken na het ontgooien worden vermeerderd. Het aantal passages mag niet hoger zijn dan 21. De reactiviteitscontrole moet worden uitgevoerd in overeenstemming met de procedures die in de punten 18-22 worden beschreven.

12. Voor het testen worden U937-cellen geënt met een dichtheid van ofwel 3×10^5 cellen/ml ofwel 6×10^5 cellen/ml, en gedurende respectievelijk 2 dagen of 1 dag voorgekweekt in kweekflessen. Het voorkweken kan plaatsvinden onder andere omstandigheden als daarvoor voldoende wetenschappelijke onderbouwing wordt gegeven en deze omstandigheden aantoonbaar – bijvoorbeeld door de stoffen voor bekwaamheidstoetsing in aanhangsel 2.2 te testen – vergelijkbare resultaten opleveren. Op de dag dat de test wordt uitgevoerd, worden cellen die uit de kweekfles worden geoogst, geresuspendeerd met vers kweekmedium bij een dichtheid van 5×10^5 cellen/ml. Vervolgens worden de cellen verdeeld over een 96-putjesplaat met vlakke bodem met 100 µl (uiteindelijke celdichtheid $0,5 \times 10^5$ cellen/putje).

Bereiding van test- en controlestoffen

13. Voorafgaand aan de test wordt de oplosbaarheid beoordeeld. Daartoe worden teststoffen bij een concentratie van 50 mg/ml opgelost of stabiel gedispergeerd in volledig medium als eerste oplosmiddel-optie of dimethylsulfoxide (DMSO, zuiverheid $\geq 99\%$) als tweede oplosmiddel/vehiculum-optie, indien de teststof niet oplosbaar is in volledig medium als oplosmiddel/vehiculum. Voor het testen wordt de teststof opgelost tot een uiteindelijke concentratie van 0,4 mg/ml in volledig medium als de chemische stof in dit oplosmiddel/vehiculum oplosbaar is. Als de chemische stof alleen in DMSO oplosbaar is, wordt de stof opgelost bij een concentratie van 50 mg/ml. Andere oplosmiddelen/vehicula dan die welke hierboven worden beschreven, mogen worden gebruikt als daarvoor een voldoende wetenschappelijke onderbouwing wordt gegeven. De stabiliteit van de teststof in het uiteindelijke oplosmiddel/vehiculum moet in aanmerking worden genomen.
14. De test- en controlestoffen worden bereid op de dag van de tests. Omdat er geen dosisbepalingstest wordt uitgevoerd, moeten voor de eerste testrun zes uiteindelijke concentraties worden getest (1, 10, 20, 50, 100 en 200 µg/ml) in het bijbehorende oplosmiddel/vehiculum, ofwel in volledig medium, ofwel in 0,4 % DMSO in medium.

Voor de daaropvolgende testruns, beginnend vanaf de 0,4 mg/ml in volledig medium of 50 mg/ml in DMSO, worden oplossingen van de teststoffen (ten minste vier werkoplossingen, d.w.z. ten minste vier concentraties) bereid met behulp van het bijbehorende oplosmiddel/vehiculum. De werkoplossingen worden uiteindelijk gebruikt voor behandeling door een gelijke hoeveelheid U937-celsuspensie (zie punt 11) toe voegen aan de hoeveelheid werkoplossing in de plaat om zo een verdere tweevoudige verdunning te verkrijgen (12). De concentraties (ten minste vier) voor elke volgende testrun worden gekozen op basis van de afzonderlijke resultaten van alle voorafgaande testruns (8). De bruikbare uiteindelijke concentraties zijn: 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 en 200 µg/ml. De maximale uiteindelijke concentratie is 200 µg/ml. Wanneer bij 1 µg/ml een positieve waarde voor CD86 wordt waargenomen, wordt 0,1 µg/ml beoordeeld om de concentratie van de teststof te vinden die niet leidt tot een CD86-waarde boven de positieve drempelwaarde. Voor elke testrun wordt de EC150 (concentratie waarbij een chemische stof de positieve drempelwaarde van 150 % voor CD86 bereikt, zie punt 19) berekend als een positieve concentratierespons voor CD86 wordt waargenomen. Wanneer de teststof een positieve CD86-respons oplevert die geen verband houdt met de concentratie, is het mogelijk niet zinvol de EC150 te berekenen, zoals beschreven in U-SENSTM DB-ALM protocol nr. 183 (12). Voor elke testrun wordt, waar mogelijk, de CV70 (concentratie waarbij een chemische stof de drempelwaarde van 70 % voor cytotoxiciteit bereikt, zie punt 19) berekend (12). Om het concentratie-responseffect van CD86-toename te onderzoeken, moeten concentraties van de bruikbare concentraties die worden gekozen gelijkmatig verdeeld zijn tussen de EC150 (of de hoogste CD86-negatieve niet-cytotoxische concentratie) en de CV70 (of de hoogste toegestane concentratie, d.w.z. 200 µg/ml). Per testrun moeten ten minste vier concentraties worden getest, waarvan ten minste twee concentraties hetzelfde zijn als in de voorgaande testrun(s), met het oog op vergelijking.

15. De oplosmiddel-/vehiculumcontrole die in de U-SENSTM-test wordt gebruikt, is volledig medium (voor teststoffen die opgelost of stabiel gedispergeerd worden) (zie punt 4) of 0,4 % DMSO in volledig medium (voor teststoffen die opgelost of stabiel gedispergeerd worden in DMSO).
16. De positieve controle die in de U-SENSTM-test wordt gebruikt, is TNBS (zie punt 11), bereid in volledig medium. TNBS moet worden gebruikt als positieve controle voor de meting van de CD68-expressie met één enkele, uiteindelijke concentratie in de plaat (50 µg/ml) die een cellevensvatbaarheid > 70 % oplevert. Om een concentratie van 50 µg/ml TNBS in de plaat te verkrijgen, wordt 1 M (d.w.z. 293 mg/ml) stamoplossing van TNBS in volledig medium bereid, die weer 2 930 maal met volledig medium wordt verdund tot een werkoplossing van 100 µg/ml. Als negatieve controle moet melkzuur

(CAS 50-21-5) worden gebruikt bij 200 µg/ml opgelost in volledig medium (van een stamvoorraad van 0,4 mg/ml). In elke plaat van elke testrun worden drie duplo's van onbehandelde controle met volledig medium, oplosmiddel-/vehiculumcontrole, en negatieve en positieve controles bereid (12). Er kunnen andere geschikte positieve controles worden gebruikt als er historische gegevens beschikbaar zijn om vergelijkbare aanvaardbaarheidscriteria voor de testrun experimenten af te leiden. De aanvaardbaarheidscriteria voor de testrun zijn gelijk aan de aanvaardbaarheidscriteria voor de teststof (zie punt 12).

Het aanbrengen van de test- en controlestoffen

17. De oplosmiddel-/vehiculumcontrole of de werkoplossingen die in de punten 14-16 worden beschreven, worden in een verhouding van 1:1 (v/v) gemengd met de celsuspensies die zijn geprepareerd in de 96-putjesplaat met vlakke bodem (zie punt 12). De behandelde platen worden vervolgens gedurende 45 ± 3 uur geïncubeerd bij 37 °C met 5 % CO₂. Voorafgaand aan de incubatie worden de platen geseald met semipermeabel membraan om verdamping van vluchtige teststoffen en kruisbesmetting tussen behandelde cellen en teststoffen te voorkomen (12).

Celkleuring

18. Na 45 ± 3 uur blootstelling worden de cellen overgebracht naar een V-vormige microtiterplaat en verzameld door centrifugatie. Oplosbaarheidsinterferentie wordt gedefinieerd als kristallen of druppels die 45 ± 3 uur na de behandeling (voorafgaand aan de celkleuring) onder de microscoop worden waargenomen. Het supernatans wordt afgevoerd en de resterende cellen worden eenmaal gewassen met 100 µl ijskoude fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS) die 5 % foetaal runderserum (kleuringsbuffer) bevat. Na het centrifugeren worden de cellen geresuspendeerd met 100 µl kleuringsbuffer en gedurende 30 minuten bij 4 °C gekleurd met 5 µl (bv. 0,25 µg) FITC-gelabelde anti-CD86- of muriene IgG1 (isotype)-antilichamen, beschermd tegen het licht. De in U-SENS™ DB-ALM protocol nr. 183 (12) beschreven antilichamen moeten worden gebruikt (voor CD86: BD-PharMingen nr. 555657, kloon: Fun-1, of Caltag/Invitrogen nr. MHCD8601, kloon: BU63; en voor IgG1: BD-PharMingen nr. 555748 of Caltag/Invitrogen nr. GM4992). De ervaring van de testontwikkelaars leert dat de fluorescentie-intensiteit van de antilichamen gewoonlijk consistent is tussen verschillende partijen. Er kan voor de bepaling ook gebruikgemaakt worden van andere klonen of leveranciers van antilichamen die de reactiviteitscontrole met goed gevolg hebben doorstaan (zie punt 11). Gebruikers kunnen echter overwegen de antilichamen in de omstandigheden van hun eigen laboratorium te titreren om de beste gebruikconcentratie vast te stellen. Andere detectiesystemen, zoals met fluorochroom gelabelde anti-CD86-antilichamen, mogen worden gebruikt als zij aantoonbaar – bijvoorbeeld door de stoffen

voor bekwaamheidstoetsing in aanhangsel 2.2 te testen – vergelijkbare resultaten opleveren als met FITC geconjugeerde antilichamen. De cellen worden eerst tweemaal gewassen met 100 µl kleuringsbuffer en eenmaal met 100 µl ijskoude PBS. Vervolgens worden ze geresuspendeerd in ijskoude PBS (bv. 125 µl voor monsters die handmatig buisje voor buisje worden geanalyseerd, of 50 µl bij gebruik van een autosamplerplaat) en wordt PI-oplossing toegevoegd (uiteindelijke concentratie 3 µg/ml). Andere cytotoxiciteitsmarkers, zoals 7-aminoactinomycine D (7-AAD) of trypaanblauw, mogen worden gebruikt als de alternatieve kleurstoffen aantoonbaar vergelijkbare resultaten opleveren als PI, bijvoorbeeld door de stoffen voor bekwaamheidstoetsing in aanhangsel 2.2 te testen.

Flowcytometrieanalyse

19. Het expressieniveau van CD86 en de cellevensvatbaarheid worden geanalyseerd met behulp van flowcytometrie. De grootte (FSC) en de granulariteit (SSC) van de cellen wordt weergegeven in een spreidingsdiagram op een logaritmische schaal, teneinde de populatie in een eerste gate, R1, duidelijk vast te stellen en het debris te elimineren. Voor elke putje wordt een doeltotaal van 10 000 cellen in de R1-gate verzameld. Cellen uit dezelfde R1-gate worden weergegeven in een FL3- of FL4/SSC-spreidingsdiagram. Levensvatbare cellen worden afgebeeld door een tweede gate, R2, te plaatsen, die de populatie propidiumjodide-negatieve cellen selecteert (FL3- of FL4-kanaal). De cellevensvatbaarheid kan worden berekend door in het cytometeranalyseprogramma de onderstaande vergelijking te gebruiken. Wanneer de cellevensvatbaarheid laag is, kunnen er maximaal 20 000 cellen, met inbegrip van dode cellen, worden verzameld. Een andere mogelijkheid is dat gedurende één minuut na de start van de analyse gegevens worden verzameld.

$$\text{Cellelevensvatbaarheid} = \frac{\text{Aantal levende cellen}}{\text{Totaal aantal verzamelde cellen}} \times 100$$

Van deze levensvatbare cellen die gegatet zijn op R2 (binnen R1) wordt vervolgens het percentage FL1-positieve cellen gemeten. De expressie van CD86 op het celoppervlak wordt geanalyseerd in een FL1-/SSC-spreidingsdiagram dat gericht is op levensvatbare cellen (R2).

Voor de putjes met volledig medium/IgG1 wordt de analysemarker dicht bij de hoofdpopulatie gezet, zodat de controles met volledig medium IgG1 bevatten binnen het doelgebied van 0,6 to 0,9 %.

Kleurinterferentie wordt gedefinieerd als een verschuiving van het spreidingsdiagram van de FITC-gelabelde-IgG1 (geometrisch gemiddelde SI van IgG1 FL1 $\geq$ 150 %).

De stimuleringsindex (SI) van CD86 voor controlecellen (onbehandeld of in 0,4 % DMSO) en met de chemische stof behandelde cellen wordt berekend aan de hand van de volgende vergelijking:

$$S.I. = \frac{\% \text{ van } CD86^{+}\text{-behandelde cellen} - \% \text{ van } IgG1^{+}\text{-behandelde cellen}}{\% \text{ van } CD86^{+}\text{-controlecellen} - \% \text{ van } IgG1^{+}\text{-controlecellen}} \times 100$$

% van onbehandelde IgG1⁺-controlecellen: aangeduid als percentage FL1-positieve IgG1-cellen die binnen de levensvatbare onbehandelde cellen zijn gedefinieerd met de analysemarker (aanvaard bereik van $\geq 0,6\%$ en $< 1,5\%$, zie punt 22).

% van IgG1⁺/CD86⁺-controlecellen/behandelde cellen: aangeduid als percentage FL1-positieve IgG1/CD86-cellen, gemeten zonder de analysemarker binnen de levensvatbare controlecellen/behandelde cellen te verplaatsen.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Evaluatie van de gegevens

20. In de U-SENSTM-test worden de volgende parameters berekend: de CV70-waarde, d.w.z. een concentratie waarbij 70 % van de U937-cellen overleeft (30 % cytotoxiciteit) en de EC150-waarde, d.w.z. de concentratie waarbij de teststoffen een CD86-SI van 150 % tot resultaat hadden.

De CV70 wordt berekend door middel van loglineaire interpolatie aan de hand van de volgende vergelijking:

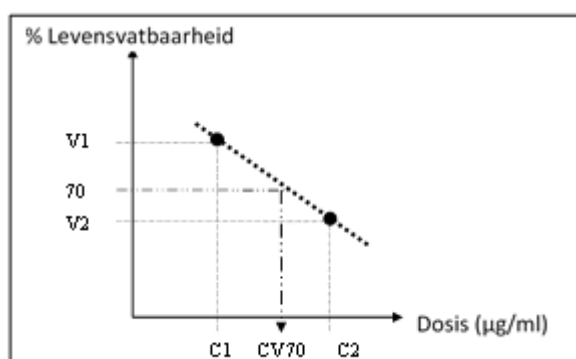
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

waarbij:

V1 de minimumwaarde is van cellevensvatbaarheid hoger dan 70 %

V2 de maximumwaarde is van cellevensvatbaarheid lager dan 70 %

C1 en C2 de concentraties zijn die de waarde van respectievelijk cellevensvatbaarheid V1 en V2 vertonen.



Er mogen andere methoden worden gebruikt om de CV70 af te leiden, zolang wordt aangetoond dat dit niet van invloed is op de resultaten (bv. door de stoffen voor

bekwaamheidstoetsing te testen).

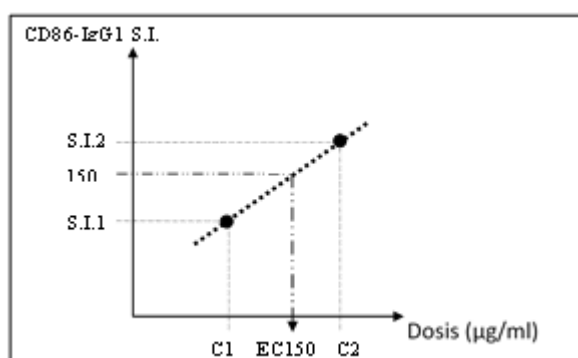
De EC150 wordt berekend door middel van loglineaire interpolatie aan de hand van de volgende vergelijking:

$$EC150 = C1 + [(150 - SI1) / (SI2 - SI1) * (C2 - C1)]$$

waarbij:

C1 de hoogste concentratie in µg/ml is met een CD86-SI < 150 % (SI1)

C2 de laagste concentratie in µg/ml is met een CD86-SI ≥ 150 % (SI2).



De EC150- en CV70-waarden worden berekend

- voor elke testrun: de afzonderlijke EC150- en CV70-waarden worden gebruikt als instrument om het concentratie-responseffect van CD86-toename te onderzoeken (zie punt 14),
- op grond van de gemiddelde levensvatbaarheden wordt de totale CV70 bepaald (12),
- op grond van de gemiddelde SI van CD86-waarden wordt de totale EC150 bepaald voor de teststof waarvan de U-SENSTM voorspelde dat deze POSITIEF zou zijn (zie punt 21) (12).

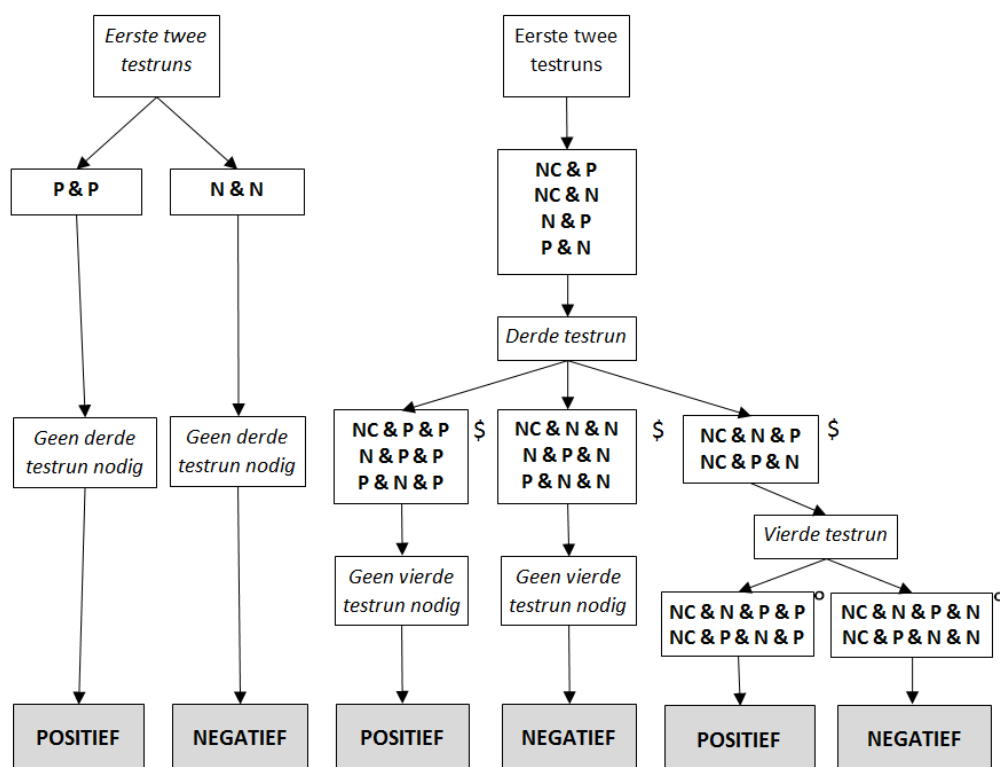
Voorspellingsmodel

21. Voor de meting van de CD86-expressie wordt elke teststof in ten minste vier concentraties en in ten minste twee onafhankelijke testruns (uitgevoerd op verschillende dagen) getest om één enkele voorspelling af te leiden (NEGATIEF of POSITIEF).
 - De afzonderlijke uitslag van een U-SENSTM-testrun wordt negatief geacht (hierna N genoemd) als de SI van CD86 lager is dan 150 % bij alle niet-toxische concentraties (cellevensvatbaarheid ≥ 70 %) en als geen interferentie wordt waargenomen (cytotoxiciteit, oplosbaarheid: zie punt 18 of kleur: zie punt 19, ongeacht de niet-cytotoxische concentraties waarbij de interferentie wordt gedetecteerd). In alle andere

gevallen: SI van CD86 hoger dan of gelijk aan 150 % en/of interferenties waargenomen, wordt de afzonderlijke uitslag van een U-SENSTM-testrun positief geacht (hierna P genoemd).

- Een U-SENSTM-voorspelling wordt NEGATIEF geacht als ten minste twee onafhankelijke testruns negatief (N) zijn (figuur 1). Als de eerste twee testruns beide negatief (N) zijn, wordt de U-SENSTM-voorspelling NEGATIEF geacht en is een derde testrun niet nodig.
- Een U-SENSTM-voorspelling wordt POSITIEF geacht als ten minste twee onafhankelijke testruns positief (P) zijn (figuur 1). Als de eerste twee testruns positief (P) zijn, wordt de U-SENSTM-voorspelling POSITIEF geacht en is een derde testrun niet nodig.
- Een uitzondering hierop, omdat er geen dosisbepalingstest wordt uitgevoerd, is wanneer de SI van CD86 in de eerste testrun uitsluitend bij de hoogste niet-cytotoxische concentratie hoger dan of gelijk aan 150 % is. In dat geval wordt de testrun TWIJFELACHTIG (T) geacht en moeten in extra testruns aanvullende concentraties worden getest (tussen de hoogste niet-toxische concentratie en de laagste toxische concentratie – zie punt 20). Als een testrun als T wordt aangemerkt, moeten ten minste twee aanvullende testruns worden uitgevoerd, en een vierde testrun als de testruns 2 en 3 niet overeenstemmen (N en/of P zelfstandig) (figuur 1). Vervolgtestruns worden positief geacht zelfs als slechts één niet-cytotoxische concentratie een CD86 gelijk aan of hoger dan 150 % oplevert, omdat de vastgestelde concentratie voor de specifieke teststof is aangepast. De uiteindelijke voorspelling is gebaseerd op het resultaat van de meerderheid van de drie of vier afzonderlijke testruns (d.w.z. twee van de drie of twee van de vier) (figuur 1).

Figuur 1: voorspellingsmodel dat wordt gebruikt in de U-SENSTM-test. Een U-SENSTM-voorspelling moet worden bekeken in het kader van een IATA en in overeenstemming met hetgeen bepaald is in punt 4 en in de punten 7, 8 en 9 van de algemene inleiding.



N: testrun waarin geen CD86-positief of interferentie wordt waargenomen;

P: testrun waarin CD86-positief of interferentie wordt waargenomen;

T: twijfelachtig. Eerste testrun met uitslag 'Twijfelachtig' uitsluitend wanneer CD86 positief is bij de hoogste niet-toxische concentratie;

#: uitsluitend in de eerste testrun maakt een afzonderlijke uitslag 'Twijfelachtig' (T) automatisch een derde testrun noodzakelijk om een meerderheid van Positieve (P) of Negatieve (N) uitslagen in ten minste twee van de drie onafhankelijke testruns te bereiken.

\$: de vakken tonen de relevante combinaties van resultaten van de drie testruns op basis van de resultaten in de eerste twee testruns die in het bovenstaande vak worden getoond.

°: de vakken tonen de relevante combinaties van resultaten van de vier testruns op basis van de resultaten in de eerste drie testruns die in het bovenstaande vak worden getoond.

Aanvaardbaarheidscriteria

22. Bij gebruik van de U-SENS™-test moet aan de volgende aanvaardbaarheidscriteria worden voldaan (12).

- Aan het eind van de blootstelling van 45 ± 3 uur moet de gemiddelde levensvatbaarheid van onbehandelde U937-cellen in drievoud $> 90 \%$ zijn en mag er geen verschuiving in CD86-expressie worden waargenomen. De basale CD86-expressie van onbehandelde U937-cellen moet binnen een bereik van $\geq 2 \%$ en $\leq 25 \%$ liggen.

- Wanneer als oplosmiddel DMSO wordt gebruikt, wordt de validiteit van de controle met DMSO-vehiculum beoordeeld door de DMSO-SI in vergelijking met onbehandelde cellen te berekenen, en de gemiddelde cellevensvatbaarheid in drievoud moet $> 90 \%$ zijn. De controle met DMSO-vehiculum is geldig als de gemiddelde waarde van de CD86-SI in drievoud ervan kleiner is dan 250% van het gemiddelde van de CD86-SI in drievoud van onbehandelde U937-cellen.
- De testruns worden geldig geacht als ten minste twee van de drie IgG1-waarden van onbehandelde U937-cellen binnen een bereik van $\geq 0,6 \%$ en $< 1,5 \%$ liggen.
- De tegelijkertijd geteste negatieve controle (melkzuur) wordt geldig geacht als ten minste twee van de drie duplo's negatief ($CD86-SI < 150 \%$) en niet-cytotoxisch (cellevensvatbaarheid $\geq 70 \%$) zijn.
- De positieve controle (TNBS) wordt geldig geacht als ten minste twee van de drie duplo's positief ($CD86-SI \geq 150 \%$) en niet-cytotoxisch (cellevensvatbaarheid $\geq 70 \%$) zijn.

Testverslag

23. 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-nummer(s), SMILES- of InChI-code(s), structuurformules en/of andere identificatiemiddelen;
- fysisch voorkomen, oplosbaarheid in volledig medium, oplosbaarheid in DMSO, molecuulgewicht en andere relevante fysisch-chemische eigenschappen, voor zover die beschikbaar zijn;
- zuiverheid, chemische naam van onzuiverheden waar passend en praktisch haalbaar enz.;
- behandeling voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);
- geteste concentratie(s);
- opslagomstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar;
- motivering van de keuze van het oplosmiddel/vehiculum voor elke teststof.

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;

- fysisch voorkomen, oplosbaarheid in volledig medium, oplosbaarheid in DMSO en andere relevante fysisch-chemische eigenschappen, voor zover die beschikbaar zijn;
- molecuulgewicht of schijnbaar molecuulgewicht in het geval van mengsels/polymeren waarvan de samenstelling bekend is, of andere informatie die relevant is voor het verloop van de studie;
- behandeling voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);
- geteste concentratie(s);
- opslagomstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar;
- motivering van de keuze van het oplosmiddel/vehiculum voor elke teststof.

Controles

Positieve controle

- chemische identificatie, zoals IUPAC- of CAS-na(a)m(en), CAS-nummer(s), SMILES- of InChI-code(s), structuurformules en/of andere identificatiemiddelen;
- fysisch voorkomen, oplosbaarheid in DMSO, molecuulgewicht en andere relevante fysisch-chemische eigenschappen, voor zover die beschikbaar zijn en voor zover van toepassing;
- zuiverheid, chemische naam van onzuiverheden waar passend en praktisch haalbaar enz.;
- behandeling voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);
- geteste concentratie(s);
- opslagomstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar;
- verwijzing naar historische positievecontrolesresultaten waaruit de geschiktheid van de aanvaardbaarheidscriteria voor de testrun blijkt, indien van toepassing.

Negatieve controle en oplosmiddel-/vehiculumcontrole

- chemische identificatie, zoals IUPAC- of CAS-na(a)m(en), CAS-nummer(s), SMILES- of InChI-code(s), structuurformules en/of andere identificatiemiddelen;
- zuiverheid, chemische naam van onzuiverheden waar passend en praktisch haalbaar enz.;
- fysisch voorkomen, molecuulgewicht en andere relevante fysisch-chemische eigenschappen, in het geval er andere controle-oplosmiddelen/-vehicula worden gebruikt dan diegene die worden vermeld in de testrichtlijn, en voor zover beschikbaar;
- opslagomstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar;

- motivering van de keuze van het oplosmiddel/vehiculum voor elke teststof.

Testomstandigheden

- naam en adres van de opdrachtgever, testinstallatie en de onderzoeksleider;
- een beschrijving van de gebruikte test;
- gebruikte cellijn, omstandigheden waarin die werd bewaard en oorsprong (bv. de instelling waarvan de cellijn werd verkregen);
- gebruikte flowcytometrie (bv. model), met inbegrip van de gebruikte instrumentinstellingen, antilichamen en cytotoxiciteitsmarker;
- de procedure die gebruikt is om aan te tonen dat het laboratorium bekwaam is om de test uit te voeren, door de stoffen voor bekwaamheidstoetsing te testen, en de procedure die gebruikt is om aan te tonen dat de resultaten van de test in de loop van de tijd kunnen worden gereproduceerd, bv. controlegegevens uit het verleden en/of gegevens van reactiviteitscontroles uit het verleden.

Aanvaardbaarheidscriteria voor de test

- Cellevensvatbaarheid en CD86-SI-waarden die met de oplosmiddel-/vehiculumcontrole zijn verkregen in vergelijking met het aanvaardbaarheidsbereik;
- cellevensvatbaarheid en SI-waarden die met de positieve controle zijn verkregen in vergelijking met het aanvaardbaarheidsbereik;
- cellevensvatbaarheid van alle geteste concentraties van de teststof.

Werkwijze

- aantal gebruikte testruns;
- de gehanteerde concentraties van de teststof, toedienings- en blootstellingstijd (indien verschillend van de aanbevolen tijd);
- duur van de blootstelling;
- een beschrijving van de gebruikte beoordelings- en beslissingscriteria;
- een beschrijving van eventuele modificaties van de testprocedure.

Resultaten

- tabel van de gegevens, waaronder CV70 (indien van toepassing), SI, cellevensvatbaarheidswaarden, EC150-waarden (indien van toepassing) die zijn verkregen voor de teststof en voor de positieve controle in elke testrun, en een indicatie van de score van de teststof volgens het voorspellingsmodel;

- een beschrijving van eventuele andere relevante waarnemingen.

Bespreking van de resultaten

- bespreking van de resultaten verkregen met de U-SENSTM-test;
- overweging van de testresultaten in de context van een IATA, als er andere relevante informatie beschikbaar is.

Conclusies

LITERATUUR

- (1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.
- (2) EURL CEVMA (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Beschikbaar op: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations
- (3) EC EURL CEVMA (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28178 EN; doi 10.2787/815737. Beschikbaar op: [\[http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705\]](http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705).
- (4) EC EURL CEVMA (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28553 EN; doi 10.2760/588955. Beschikbaar op: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/euro-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing>.
- (5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.
- (6) OESO (2016). Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs. Beschikbaar op: [\[http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm\]](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm).
- (7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.
- (8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.

- (9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehn, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.
- (10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1696.
- (11) OESO (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs. Beschikbaar op: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.
- (12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENSTM), 33pp. Beschikbaar op: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].
- (13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.
- (14) OESO (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs. Beschikbaar op: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (15) Verenigde Naties (VN) (2015). Mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Zesde herziene editie, New York en Genève: United Nations Publications. Beschikbaar op: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (16) OESO (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs. Beschikbaar op: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.

- (17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Beschikbaar op: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Aanhangsel 2.1

DEFINITIES

AOP (Adverse Outcome Pathway): een reeks gebeurtenissen van de chemische structuur van een doelstof of een groep soortgelijke chemische stoffen, van de moleculaire inleidende gebeurtenis tot een te onderzoeken in-vivoresultaat (15).

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een test, 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 (14).

CD86-concentratierespons: Er is sprake van concentratieafhankelijkheid (of concentratierespons) wanneer een positieve concentratie $CD86-SI \geq 150$) gevolgd wordt door een concentratie met een hogere CD86-SI.

Chemische stof: een stof of een mengsel.

CV70: de geschatte concentratie waarbij de cellevensvatbaarheid 70 % is.

EC150: de geschatte concentraties waarbij de SI van CD86-expressie 150 % is.

Flowcytometrie: een cytometrische techniek waarbij in een vloeistof gesuspendeerde cellen één voor één door een brandpunt van exciterend licht stromen, dat wordt verstrooid in patronen die kenmerkend zijn voor de cellen en hun bestanddelen; de cellen worden vaak gelabeld met fluorescente markers, zodat het licht eerst wordt geabsorbeerd en vervolgens met gewijzigde frequenties wordt uitgezonden.

Geldige test: een test 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 (14).

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. Het is een maat voor de nauwkeurigheid van een test die categorale resultaten oplevert en is een belangrijke overweging bij de beoordeling van de relevantie van een test (14).

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

gevaaren van fysische aard en gevaaren 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 (16).

IATA (Integrated Approach on Testing and Assessment, geïntegreerde test- en beoordelingsbenadering): een gestructureerde aanpak die wordt gebruikt voor de identificatie van gevaaren (potentieel), het kenmerken van gevaaren (potentie) en/of het beoordelen van de veiligheid (potentieel/potentie en blootstelling) van een chemische stof of een groep chemische stoffen, waarbinnen alle relevante gegevens strategisch worden geïntegreerd en worden afgewogen als inbreng voor regelgevingsbesluiten inzake potentiële gevaaren en/of risico's en/of de noodzaak van verdere gerichte en bijgevolg minimale tests.

Kleuringsbuffer: een fosfaatgebufferde zoutoplossing met 5 % foetaal kalverserum.

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

Nauwkeurigheid: de mate van overeenstemming tussen testresultaten en erkende referentiewaarden. Het is een maat voor de prestaties van de test en één aspect van relevantie. Deze term en de term "concordantie", waaronder het percentage correcte uitkomsten van een test wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt (14).

Oplosmiddel-/vehiculumcontrole: een onbehandeld monster dat alle componenten bevat van een testsysteem met uitzondering van de teststof, maar met inbegrip van het gebruikte oplosmiddel/vehiculum. Dit monster wordt gebruikt om de referentierespons vast te stellen voor de monsters die worden behandeld met de in hetzelfde oplosmiddel/vehiculum opgeloste of stabiel gedispergeerde teststof. Als dit monster getest wordt met een tegelijkertijd gemeten mediumcontrole, toont het ook aan of het oplosmiddel/vehiculum met het testsysteem interageert.

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 in de loop van de tijd kan worden beoordeeld, mag de grootte van de positieve respons niet buitensporig zijn.

Prehaptenen: chemische stoffen die in sensibiliserende stoffen veranderen na abiotische transformatie, bv. door oxidatie.

Prohaptenen: chemische stoffen die enzymatische activering nodig hebben om hun potentieel voor huidsensibilisatie te realiseren.

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 test (14).

SI: stimuleringsindex. Relatieve waarden van de geometrisch gemiddelde fluorescentie-intensiteit in de met de chemische stof behandelde cellen vergeleken met de met oplosmiddel behandelde cellen.

Specificiteit: het percentage van alle negatieve/niet-actieve chemische stoffen dat door middel van de testmethode correct wordt ingedeeld. Het is een maat voor de nauwkeurigheid van een test die categorale resultaten oplevert en is een belangrijke overweging bij de beoordeling van de relevantie van een test (14).

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 het gelijktijdig testen van een of meer chemische stoffen met een oplosmiddel-/vehiculumcontrole en met een positieve controle.

Teststof: alle volgens deze test geteste stoffen of mengsels.

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

Verschuiving: een verschuiving wordt als volgt gedefinieerd: i) de gecorrigeerde %CD86+-waarde van de onbehandelde controleduplo 3 is minder dan 50 % van het gemiddelde van de gecorrigeerde %CD86+-waarde van de onbehandelde controleduplo's 1 en 2; en ii) de gecorrigeerde %CD86+-waarde van de negatievecontroleduplo 3 is minder dan 50 % van het gemiddelde van de gecorrigeerde %CD86+-waarde van de negatievecontroleduplo's 1 en 2.

Aanhangsel 2.2

STOFFEN VOOR BEKWAAMHEIDSTOETSING

Vooraleer over te gaan tot routinegebruik van de onder testmethode B.71 vallende test die in dit aanhangsel wordt beschreven, moeten laboratoria hun technische bekwaamheid aantonen door op de juiste wijze de verwachte U-SENSTM-voorspelling te verkrijgen voor de 10 stoffen die in tabel 1 worden aanbevolen, en door de CV70- en EC150-waarden te verkrijgen die binnen de respectieve referentiebereiken vallen voor ten minste 8 van de 10 stoffen voor bekwaamheidstoetsing. De stoffen voor bekwaamheidstoetsing zijn zodanig geselecteerd dat ze alle mogelijke responsen voor huidsensibilisatiegevaar weerspiegelen. Andere selectiecriteria waren dat stoffen in de handel beschikbaar zijn, en dat er in-vivoreferentiegegevens en met de U-SENSTM-test gegenereerde in-vitrogegevens van zeer goede kwaliteit beschikbaar zijn. Voor de U-SENSTM-test zijn tevens gepubliceerde referentiegegevens beschikbaar (1) (8).

Tabel 1: Aanbevolen stoffen voor het aantonen van technische bekwaamheid met de U-SENSTM-test

Stoffen voor bekwaamheidstoetsing	CAS RN	Fysische toestand	In-vivo voorspelling ¹	U-SENS TM Oplosmiddel/ Vehiculum	U-SENS TM CV70 Referentie- bereik in µg/ml ²	U-SENS TM EC150 Referentie- bereik in µg/ml ²
4-Fenyleendiamine	106-50-3	Vaste stof	Sensibiliserend (sterk)	Volledig medium ³	< 30	Positief (≤ 10)
Picrylsulfonzuur	2508-19-2	Vloeistof	Sensibiliserend (sterk)	Volledig medium	> 50	Positief (≤ 50)
Diëthylmaleaat	141-05-9	Vloeistof	Sensibiliserend (matig)	DMSO	10-100	Positief (≤ 20)
Resorcinol	108-46-3	Vaste stof	Sensibiliserend (matig)	Volledig medium	> 100	Positief (≤ 50)
Cinnamylalcohol	104-54-1	Vaste stof	Sensibiliserend (zwak)	DMSO	> 100	Positief (10-100)
4-Allylanisol	140-67-0	Vloeistof	Sensibiliserend (zwak)	DMSO	> 100	Positief (< 200)
Sacharine	81-07-2	Vaste stof	Niet-sensibiliserend	DMSO	> 200	Negatief (> 200)
Glycerol	56-81-5	Vloeistof	Niet-sensibiliserend	Volledig medium	> 200	Negatief (> 200)

Melkzuur	50-21-5	Vloeistof	Niet-sensibiliserend	Volledig medium	> 200	Negatief (> 200)
Salicylzuur	69-72-7	Vaste stof	Niet-sensibiliserend	DMSO	> 200	Negatief (> 200)

Afkortingen: CAS RN = registratienummer van de Chemical Abstracts Service

- ¹ De in-vivogeve- en potentievoorspelling is gebaseerd op LLKT-gegevens (1) (8). De in-vivopotentie wordt afgeleid met behulp van de criteria die zijn voorgesteld door ECETOC (17).
- ² Op basis van in het verleden waargenomen waarden (1) (8).
- ³ Volledig medium: RPMI-1640-medium, aangevuld met 10 % foetaal runderserum, 2 mM L-glutamine, 100 eenheden/ml penicilline en 100 µg/ml streptomycine (8).

Aanhangsel 3

IN-VITROHUIDSENSIBILISATIE: IL-8 LUC-BEPALING

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

1. In tegenstelling tot bepalingen die de expressie van celoppervlaktemarkers analyseren, kwantificeert de IL-8 Luc-bepaling veranderingen in de expressie van IL-8, een cytokine die in verband wordt gebracht met de activatie van dendritische cellen. In de van THP-1 afgeleide IL-8-reportercellijn (THP-G8, afkomstig van de humane acute-monocytischeleukemieceldlijn THP-1) wordt IL-8-expressie gemeten na blootstelling aan sensibiliserende stoffen (1). De expressie van luciferase wordt vervolgens gebruikt om onderscheid te maken tussen huidsensibiliserende stoffen en niet-sensibiliserende stoffen.
2. De IL-8 Luc-bepaling is in een valideringsstudie (2) beoordeeld door het Japans Centrum voor de validering van alternatieve methoden (JaCVAM), het Japanse **ministerie van Economische Zaken, Handel en Industrie** en de **Japanse Vereniging voor alternatieven voor dierproeven**, en vervolgens onderworpen aan een onafhankelijke beoordeling door vakgenoten (3) onder auspiciën van JaCVAM en het ministerie voor Volksgezondheid, Werkgelegenheid en Welzijn met steun van de **International Cooperation on Alternative Test Methods** (ICATM). Op grond van al het beschikbare bewijsmateriaal en de inbreng van regelgevers en belanghebbenden wordt de IL-8 Luc-bepaling nuttig geacht als onderdeel van een IATA om onderscheid te maken tussen huidsensibiliserende stoffen en niet-sensibiliserende stoffen met het oog op de gevarenindeling en etikettering. Voorbeelden van het gebruik van IL-8 Luc-gegevens in combinatie met andere informatie zijn beschreven in de literatuur (4) (5) (6).
3. De IL-8 Luc-bepaling bleek overdraagbaar te zijn naar laboratoria met ervaring in het kweken van cellen en luciferasemeting. De reproduceerbaarheid binnen laboratoria en tussen verschillende laboratoria was respectievelijk 87,7 % en 87,5 % (2). Uit gegevens uit de valideringsstudie (2) en andere publicaties (1) (6) blijkt dat met de IL-8 Luc-bepaling, in vergelijking met de LLKT, 118 van de 143 chemische stoffen als positief of negatief werden beoordeeld en 25 chemische stoffen als twijfelachtig, en dat de nauwkeurigheid van de IL-8 Luc-bepaling in het onderscheiden van huidsensibiliserende stoffen (VN-GHS/CLP cat. 1) van niet-sensibiliserende stoffen (VN-GHS/CLP geen categorie) 86 % is (101/118) met een gevoeligheid van 96 % (92/96) en een specificiteit van 41 % (9/22). Als de stoffen die buiten het hierna beschreven toepassingsgebied vallen (punt 5), buiten beschouwing worden gelaten, werden met de IL-8 Luc-bepaling 113 van de 136 chemische stoffen als positief of negatief beoordeeld en 23 chemische stoffen als twijfelachtig, en is de nauwkeurigheid van de IL-8 Luc-bepaling 89 % (101/113) met een gevoeligheid van

96 % (92/96) en een specificiteit van 53 % (9/17). Uitgaande van bij mensen verzamelde gegevens die worden aangehaald in Urbisch et al. (7), werden met de IL-8 Luc-bepaling 76 van de 90 chemische stoffen als positief of negatief beoordeeld en 14 chemische stoffen als twijfelachtig, en is de nauwkeurigheid 80 % (61/76), de gevoeligheid 93 % (54/58) en de specificiteit 39 % (7/18). Als de stoffen die buiten het toepassingsgebied vallen, buiten beschouwing worden gelaten, werden met de IL-8 Luc-bepaling 71 van de 84 chemische stoffen als positief of negatief beoordeeld en 13 chemische stoffen als twijfelachtig, en is de nauwkeurigheid 86 % (61/71), de gevoeligheid 93 % (54/58) en de specificiteit 54 % (7/13). Bij de IL-8 Luc-bepaling is de kans dat valsnegatieve voorspellingen betrekking hebben op chemische stoffen met een lage tot gemiddelde potentie voor huidsensibilisatie (VN-GHS/CLP-subcategorie 1B) hoger dan dat ze betrekking hebben op chemische stoffen met een hoge potentie voor huidsensibilisatie (VN-GHS/CLP-subcategorie 1A) (6). Bij elkaar genomen rechtvaardigt de informatie dat voor de IL-8 Luc-bepaling een rol is weggelegd bij het bepalen van het gevaar van huidsensibilisatie. De nauwkeurigheid die hier wordt vermeld voor de IL-8 Luc-bepaling als losstaande test vormt slechts een indicatie, aangezien de test moet worden bekeken in combinatie met andere informatiebronnen in de context van een IATA en in overeenstemming met hetgeen hierboven bepaald is in de punten 7 en 8 in de algemene inleiding. Bovendien moet bij de beoordeling van tests zonder dierproeven voor huidsensibilisatie in gedachten worden gehouden dat de LLKT en andere dierproeven de situatie van mensen mogelijk niet volledig weerspiegelen.

4. Op basis van de thans beschikbare gegevens is gebleken dat de IL-8 Luc-bepaling van toepassing is op teststoffen die verschillende organische functionele groepen, reactiemechanismen, potenties voor huidsensibilisatie (zoals bepaald bij in-vivo-onderzoek) en fysisch-chemische eigenschappen beslaan (2) (6).
5. Bij de IL-8 Luc-bepaling wordt X-VIVO™ 15 als oplosmiddel gebruikt. Met de bepaling werden chemische stoffen met een $\log K_{ow} > 3,5$ en chemische stoffen met een oplosbaarheid in water van ongeveer 100 µg/ml, zoals berekend door EPI Suite™, echter correct beoordeeld. Daarnaast detecteert de bepaling sensibiliserende stoffen die slecht oplosbaar zijn in water, beter dan de IL-8 Luc-bepaling waarbij dimethylsulfoxide (DMSO) als oplosmiddel wordt gebruikt (2). Teststoffen die niet worden opgelost bij 20 mg/ml, kunnen echter valsnegatieve uitslagen opleveren, omdat ze niet oplossen in X-VIVO™ 15. Voor deze chemische stoffen moeten negatieve resultaten dus buiten beschouwing worden gelaten. In de valideringsstudie werd een hoog percentage valsnegatieven waargenomen voor anhydriden. Bovendien zouden prohaptenen (stoffen die metabole activering nodig hebben) en prehaptenen (stoffen die worden geactiveerd door oxidatie aan de lucht) negatieve resultaten kunnen opleveren vanwege de beperkte metabole capaciteit van de cellijn (8) en als gevolg van de testomstandigheden. Hoewel

negatieve uitslagen voor vermoedelijke prehaptenen/prohaptenen dus met de nodige voorzichtigheid geïnterpreteerd moeten worden, werden niettemin 11 van de 11 prehaptenen, 6/6 prohaptenen en 6/8 prehaptenen/prohaptenen in de gegevensreeks van de IL-8 Luc-bepaling correct beoordeeld (2). Op basis van het recente uitgebreide overzicht van drie tests zonder dierproeven (de DPRA, de KeratinoSens™ en de h-CLAT) voor het detecteren van pre- en prohaptenen (9), en op basis van het feit dat de THP-G8-cellen die in de IL-8 Luc-bepaling worden gebruikt, een cellijn vormen die is afgeleid van de cellijn THP-1 die in de h-CLAT wordt gebruikt, kan de IL-8 Luc-bepaling ook bijdragen aan een grotere gevoeligheid van tests zonder dierproeven bij het detecteren van pre- en prohaptenen in combinatie met andere tests. Tot dusver leverden oppervlakteactieve stoffen (vals)positieve resultaten op, ongeacht tot welk type ze behoorden (bv. kationisch, anionisch of niet-ionisch). Tot slot kunnen teststoffen die interfereren met luciferase de luciferaseactiviteit/-meting verstoren, doordat zij een schijnbare remming of verhoging van de luminescentie veroorzaken (10). Zo werd bij andere reportergebepalingen op basis van luciferase gemeld dat fyto-oestrogenconcentraties boven 1 µM interfereerden met luminescentiesignalen vanwege overactiviteit van het luciferasereporter. De luciferase-expressie bij hoge concentraties fyto-oestrogenen of soortgelijke verbindingen waarvan vermoed wordt dat zij fyto-oestrogenachtige activatie van het luciferasereporter kunnen veroorzaken, moet daarom zorgvuldig worden bestudeerd (11). Op grond van het bovenstaande vallen oppervlakteactieve stoffen, anhydriden en chemische stoffen die interfereren met luciferase buiten het toepassingsgebied van deze bepaling. In gevallen waarin kan worden aangetoond dat de IL-8 Luc-bepaling niet toepasselijk is op andere specifieke categorieën teststoffen, mag de testmethode niet worden gebruikt voor die specifieke categorieën.

6. Zoals hierboven beschreven, helpt de IL-8 Luc-bepaling om huidsensibiliserende stoffen te onderscheiden van niet-sensibiliserende stoffen. Nader onderzoek, bij voorkeur op basis van bij mensen verzamelde gegevens, is nodig om te bepalen of IL-8 Luc-resultaten, in combinatie met andere informatiebronnen, kunnen bijdragen aan potentiebeoordeling.
7. Definities worden gegeven in aanhangsel 3.1.

PRINCIPE VAN DE TEST

8. De IL-8 Luc-bepaling maakt gebruik van een humane monocytische leukemieceldlijn THP-1, afkomstig van de American Type Culture Collection (Manassas, VA, VS). Deze cellijn werd door de faculteit Dermatologie van de Tohoku University School of Medicine in Japan gebruikt om een van THP-1 afgeleide IL-8-reporterceldlijn, THP-G8, te maken. THP-G8 omvat de luciferasegenen Stable Luciferase Orange (SLO) en Stable Luciferase Red (SLR), die worden gecontroleerd door de promotors van respectievelijk IL-8 en

glyceraldehyde-3-fosfaatdehydrogenase (GAPDH) (1). Daardoor wordt een kwantitatieve meting via luminescentiedetectie van de inductie van het luciferasegen met behulp van gangbare lichtproducerende luciferasesubstraten mogelijk, als indicator van de activiteit van IL-8 en GAPDH in cellen die zijn blootgesteld aan sensibiliserende stoffen.

9. Het op twee kleuren gebaseerde testsysteem omvat een oranje licht uitzendende luciferase (SLO; $\lambda_{\text{max}} = 580 \text{ nm}$) (12) voor de genexpressie van de IL-8-promotor, alsmede een rood licht uitzendende luciferase (SLR; $\lambda_{\text{max}} = 630 \text{ nm}$) (13) voor de genexpressie van de internecontrolepromotor, GAPDH. De twee luciferasen zenden, wanneer ze reageren met het in vuurvlieggen voorkomende d-luciferine, verschillende kleuren licht uit en hun luminescentie wordt gelijktijdig gemeten in een enkelvoudige reactie, door met behulp van een optisch filter de emissie van het testmengsel te scheiden (14) (aanhangsel 3.2).
10. THP-G8-cellen worden gedurende 16 uur met de teststof behandeld. Vervolgens worden de SLO-luciferase-activiteit (SLO-LA) die de activiteit van de IL-8-promotor weerspiegelt, en de SLR-luciferase-activiteit (SLR-LA), die de activiteit van de GAPDH-promotor weerspiegelt, gemeten. Met het oog op de begrijpelijkheid worden SLO-LA en SLR-LA aangeduid als respectievelijk IL8LA en GAPLA. In tabel 1 worden de termen beschreven die betrekking hebben op luciferase-activiteit in de IL-8 Luc-bepaling. De gemeten waarden worden gebruikt als een indicator voor cytotoxiciteit en om het volgende te berekenen: de genormaliseerde IL8LA (nIL8LA), d.w.z. de verhouding van IL8LA tot GAPLA; de inductie van nIL8LA (Ind-IL8LA), d.w.z. de verhouding van de rekenkundige gemiddelden van viervoudig gemeten waarden van de nIL8LA van THP-G8-cellen die zijn behandeld met een teststof, en de waarden van de nIL8LA van onbehandelde THP-G8-cellen; en de remming van GAPLA (Inh-GAPLA), d.w.z. de verhouding van de rekenkundige gemiddelden van viervoudig gemeten waarden van de GAPLA van THP-G8-cellen die zijn behandeld met een teststof, en de waarden van de GAPLA van onbehandelde THP-G8-cellen. Inh-GAPLA wordt gebruikt als een indicator voor cytotoxiciteit.

Tabel 1: Beschrijving van termen die betrekking hebben op de luciferase-activiteit in de IL-8 Luc-bepaling

Afkortingen	Definitie
GAPLA	SLR-luciferase-activiteit, die de activiteit van de GAPDH-promotor weerspiegelt
IL8LA	SLO-luciferase-activiteit, die de activiteit van de IL-8-promotor weerspiegelt
nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA van met chemische stoffen behandelde THP-G8-cellen / nIL8LA van onbehandelde cellen
Inh-GAPLA	GAPLA van met chemische stoffen behandelde THP-G8-cellen / GAPLA van onbehandelde cellen

CV05 De laagste concentratie van de chemische stof waarbij de Inh-GAPLA < 0,05 wordt.

11. Er zijn prestatienormen (15) beschikbaar om de validering van gewijzigde in-vitro-IL-8-luciferasetests die vergelijkbaar zijn met de IL-8 Luc-bepaling, te vergemakkelijken en tijdige wijziging van OESO-testrichtlijn 442E met het oog op de opname van dergelijke tests 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 opgenomen in testrichtlijn 442E (16).

AANTONING VAN BEKWAAMHEID

12. Vooraleer over te gaan tot routinegebruik van de onder testmethode B.71 vallende test die in dit aanhangsel wordt beschreven, moeten laboratoria hun technische bekwaamheid aantonen met de 10 stoffen voor bekwaamheidstoetsing die in aanhangsel 3.3 worden genoemd, met inachtneming van de OESO-leidraad "Good *in vitro* Method Practices" (17). Gebruikers van de test moeten bovendien een historische gegevensbank bijhouden van de gegevens die het resultaat zijn van de reactiviteitscontroles (zie punt 15), de positieve controles en oplosmiddel-/vehiculumcontroles (zie punten 21-24). Zij moeten deze gegevens gebruiken om te bevestigen dat de reproduceerbaarheid van de test in hun laboratorium in de loop van de tijd gehandhaafd blijft.

PROCEDURE

13. De standaardwerkwijze voor de IL-8 Luc-bepaling is beschikbaar en moet worden gevolgd wanneer de test wordt uitgevoerd (18). Laboratoria die de test willen uitvoeren, kunnen de recombinante THP-G8-cel lijn verkrijgen bij GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan, na ondertekening van een overeenkomst inzake overdracht van materiaal (MTA) in overeenstemming met de voorwaarden van het OESO-model. In de volgende punten worden de belangrijkste onderdelen en procedures van de bepaling beschreven.

Celpreparaten

14. Voor het uitvoeren van de IL-8 Luc-test moet de THP-G8-cel lijn van GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan, worden gebruikt (zie punten 8 en 13). Bij ontvangst worden de cellen vermeerderd (2-4 passages) en in bevroren toestand bewaard als homogene stam. Cellen van deze stam kunnen maximaal 12 passages of maximaal 6 weken worden vermeerderd. Het medium dat voor het vermeerderen wordt gebruikt, is het RPMI-1640-kweekmedium met 10 % foetaal runderserum (FBS), antibiotica/antimycotica-oplossing (100 U/ml

penicilline G, 100 µg/ml streptomycine en 0,25 µg/ml amfotericine B in 0,85 % zoutoplossing) (bv. GIBCO cat. nr. 15240-062), 0,15 µg/ml puromycine (bv. CAS:58-58-2) en 300 µg/ml G418 (bv. CAS:108321-42-2).

15. Voordat de cellen voor tests worden gebruikt, moet hun geschiktheid worden vastgesteld aan de hand van een reactiviteitscontrole. Deze controle moet 1-2 weken of 2-4 passages na het ontdooien worden uitgevoerd met behulp van de positieve controle 4-nitrobenzylbromide (4-NBB) (CAS:100-11-8, zuiverheid $\geq 99\%$) en de negatieve controle melkzuur (CAS:50-21-5, zuiverheid $\geq 85\%$). 4-NBB moet een positieve respons op Ind-IL8LA opleveren ($\geq 1,4$), terwijl melkzuur een negatieve respons op Ind-IL8LA ($< 1,4$) moet opleveren. Voor de bepaling worden uitsluitend de cellen gebruikt die de reactiviteitscontrole met goed gevolg doorstaan. De controle moet worden uitgevoerd in overeenstemming met de procedures die in de punten 22-24 worden beschreven.
16. Voor het testen worden THP-G8-cellen geënt met een dichtheid van 2 tot 5×10^5 cellen/ml en gedurende 48 tot 96 uur voorgekweekt in kweekflessen. Op de dag van de test worden de cellen die uit de kweekfles worden geoogst, gewassen met RPMI-1640 dat 10 % FBS en geen antibiotica bevat, en vervolgens met een dichtheid van 1×10^6 cellen/ml geresuspendeerd met RPMI-1640 dat 10 % FBS en geen antibiotica bevat. Vervolgens worden de cellen verdeeld over een zwarte 96-putjesplaat met vlakke bodem (bv. Costar cat. nr. 3603) met 50 µl (5×10^4 cellen/putje).

Bereiding van de teststof en de controlestoffen

17. De teststof en controlestoffen worden bereid op de dag van de tests. Voor de IL-8 Luc-bepaling worden teststoffen opgelost in X-VIVO™ 15, een in de handel verkrijgbaar, serumvrij medium (Lonza, 04-418Q), tot een uiteindelijke concentratie van 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 wordt in a microcentrifugebuisje toegevoegd aan 20 mg van de teststof (ongeacht de oplosbaarheid van de chemische stof) tot een volume van 1 ml is bereikt. Vervolgens wordt het busje krachtig gevortext en geschud op een rotor met een maximumsnelheid van 8 rpm gedurende 30 minuten bij een omgevingstemperatuur van ongeveer 20 °C. Als vaste chemische stoffen nog steeds niet zijn opgelost, wordt het busje bovendien ultrasoon behandeld tot de chemische stof volledig is opgelost of stabiel is gedispergeerd. Voor teststoffen die oplosbaar zijn in X-VIVO™ 15 wordt de oplossing met een factor 5 verdund met X-VIVO™ 15 en gebruikt als een X-VIVO™ 15-stamoplossing van de teststof (4 mg/ml). Voor teststoffen die niet oplosbaar zijn in X-VIVO™ 15, wordt het mengsel gedurende ten minste 30 minuten opnieuw geroteerd en vervolgens gedurende 5 minuten gecentrifugeerd met 15 000 rpm ($\approx 20\,000\text{ g}$); het resulterende supernatans wordt gebruikt als een X-VIVO™ 15-stamoplossing van de teststof. Voor het gebruik van andere oplosmiddelen, zoals DMSO, water of het kweekmedium, moet een wetenschappelijke onderbouwing worden gegeven. De procedure voor het oplossen van chemische stoffen

wordt in aanhangsel 3.5 in detail weergegeven. De X-VIVO™ 15-oplossingen die in de punten 18-23 worden beschreven, worden in een verhouding van 1:1 (v/v) gemengd met de celsuspensies die zijn geprepareerd in een zwarte 96-putjesplaat met vlakke bodem (zie punt 16).

18. De eerste test die wordt uitgevoerd, heeft tot doel de cytotoxische concentratie te bepalen en het huidsensibiliserend potentieel van chemische stoffen te onderzoeken. Met behulp van X-VIVO™ 15 worden seriële verdunningen van de X-VIVO™ 15-stamoplossingen van de teststoffen gemaakt met een verdunningsfactor 2 (zie aanhangsel 3.5), waarbij gebruikgemaakt wordt van een testblok met 96 putjes (bv. Costar cat. nr. EW-01729-03). Vervolgens wordt 50 µl/putje verdunde oplossing toegevoegd aan 50 µl van de celsuspensie in een zwarte 96-putjesplaat met vlakke bodem. Voor teststoffen die in X-VIVO™ 15 oplosbaar zijn, liggen de uiteindelijke concentraties van de teststoffen bijgevolg tussen 0,002 en 2 mg/ml (aanhangsel 3.5). Voor teststoffen die bij 20 mg/ml niet in X-VIVO™ 15 oplosbaar zijn, worden alleen verdunningsfactoren tussen 2 en 2^{10} bepaald, al blijven de daadwerkelijke uiteindelijke concentraties van de teststoffen onzeker en zijn deze afhankelijk van de verzadigde concentratie van de teststoffen in de X-VIVO™ 15-stamoplossing.
19. In daaropvolgende testruns (d.w.z. de tweede, derde en vierde duplo's) wordt de X-VIVO™ 15-stamoplossing gemaakt in een concentratie die viermaal hoger is dan de CV05-concentratie (CV05: cellevensvatbaarheid 05; de laagste concentratie waarbij de Inh-GAPLA $< 0,05$ wordt) in het eerste experiment. Als de Inh-GAPLA in de eerste testrun bij de hoogste concentratie niet onder de 0,05 komt, wordt de X-VIVO™ 15-stamoplossing gemaakt op basis van de hoogste concentratie in de eerste testrun. De CV05-concentratie wordt berekend door de concentratie van de stamoplossing in de eerste testrun te delen door de verdunningsfactor voor CV05 (X) (verdunningsfactor CV05 (X); de verdunningsfactor die vereist is om de stamoplossing te verdunnen tot CV05) (zie aanhangsel 3.5). Voor teststoffen die bij 20 mg/ml niet in X-VIVO™ oplosbaar zijn, wordt de CV05 bepaald door de concentratie van de stamoplossing $\times 1/X$. Voor de testruns 2 tot en met 4 wordt een tweede stamoplossing bereid als $4 \times CV05$ (aanhangsel 3.5).
20. Seriële verdunningen van de tweede X-VIVO™ 15-stamoplossingen worden gemaakt met een verdunningsfactor van 1,5 in een testblok met 96 putjes. Vervolgens wordt 50 µl/putje verdunde oplossing toegevoegd aan 50 µl van de celsuspensie in de putjes van een zwarte 96-putjesplaat met vlakke bodem. Elke concentratie van elke teststof moet in 4 putjes worden getest. De monsters worden vervolgens gemengd op een plaatschudder en gedurende 16 uur geïncubeerd bij 37 °C en 5 % CO₂, waarna de luciferase-activiteit wordt gemeten zoals verderop beschreven.

21. De oplosmiddelcontrole is het mengsel van 50 µl/putje X-VIVO™ 15 en 50 µl/putje celsuspensie in 10 % FBS bevattend RPMI-1640.
22. De aanbevolen positieve controle is 4-NBB. 20 mg 4-NBB wordt bereid in een microcentrifugeerbuisje van 1,5 ml en aangevuld tot 1 ml met X-VIVO™ 15. Het busje wordt krachtig gevortext en geschud op een rotor met een maximumsnelheid van 8 rpm gedurende ten minste 30 minuten. Na 5 minuten centrifugeren bij 20 000 g wordt het supernatans met een factor 4 verdund met X-VIVO™ 15, waarna 500 µl van het verdunde supernatans wordt overgebracht naar een testblok met 96 putjes. Het verdunde supernatans wordt met X-VIVO™ 15 verder verdund met een factor 2 en 4, en 50 µl van de oplossing wordt toegevoegd aan 50 µl THP-G8-celsuspensie in de putjes van een zwarte 96-putjesplaat met vlakke bodem (aanhangel 3.6). Elke concentratie van de positieve controle moet in 4 putjes worden getest. De plaat wordt geschud op een plaatschudder en gedurende 16 uur geïncubeerd in een CO₂-incubator (37 °C, 5 % CO₂), waarna de luciferase-activiteit wordt gemeten zoals beschreven in punt 29.
23. De aanbevolen negatieve controle is melkzuur. 20 mg melkzuur wordt bereid in een microcentrifugebuisje van 1,5 ml en aangevuld tot 1 ml met X-VIVO™ 15 (20 mg/ml). 20 mg/ml melkzuuroplossing wordt met een factor 5 verdund met X-VIVO™ 15 (4 mg/ml); 500 µl van deze 4 mg/ml melkzuuroplossing wordt overgebracht naar een putje van een testblok met 96 putjes. Deze oplossing wordt met een factor 2 verdund met X-VIVO™ 15 en vervolgens opnieuw met een factor 2 verdund tot oplossingen van 2 mg/ml en 1 mg/ml. 50 µl van deze 3 oplossingen en vehiculumcontrole (X-VIVO™ 15) worden toegevoegd aan 50 µl THP-G8-celsuspensie in de putjes van een zwarte 96-putjesplaat met vlakke bodem. Elke concentratie van de negatieve controle wordt in 4 putjes getest. De plaat wordt geschud op een plaatschudder en gedurende 16 uur geïncubeerd in een CO₂-incubator (37 °C, 5 % CO₂), waarna de luciferase-activiteit wordt gemeten zoals beschreven in punt 29.
24. Als er historische gegevens beschikbaar zijn om vergelijkbare aanvaardbaarheidscriteria voor de testrun experimenten af te leiden, kunnen er andere geschikte positieve of negatieve controles worden gebruikt.
25. Er moet worden voorkomen – bijvoorbeeld door de platen voorafgaand aan de incubatie met de teststoffen af te dekken met een folie – dat vluchtige teststoffen verdampen en dat er kruisbesmetting met teststoffen tussen putjes optreedt.
26. Er zijn 2 tot 4 testruns nodig voordat een positieve of negatieve voorspelling kan worden afgeleid met betrekking tot de teststoffen en de oplosmiddelcontrole (zie tabel 2). Elke testrun wordt op een andere dag verricht met een verse X-VIVO™ 15-stamoplossing van

teststoffen en onafhankelijk geoogste cellen. De cellen kunnen wel uit dezelfde passage komen.

Metingen van de luciferaseactiviteit

27. De luminescentie wordt gemeten met behulp van een 96 putjes-microtiterplaat-luminometer die is uitgerust met optische filters, bv. Phelios (ATTO, Tokio, Japan), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Duitsland) en de ARVO-serie (PerkinElmer, Waltham, MA, VS). Om de reproduceerbaarheid te waarborgen, moet de luminometer voor elke test worden gekalibreerd (19). Voor deze kalibratie zijn recombinante oranje en rood licht uitzendende luciferasen beschikbaar.
28. Naar elk putje van de plaat met daarin de celsuspensie die al dan niet met een chemische stof is behandeld, wordt 100 µl voorverwarmede Tripluc® Luciferase Assay Reagent overgebracht. De plaat wordt gedurende 10 minuten geschud bij een omgevingstemperatuur van ongeveer 20 °C. De plaat wordt in de luminometer geplaatst om de luciferase-activiteit te meten. De bioluminescentie wordt gedurende 3 seconden zonder (F0) en 3 seconden met (F1) het optisch filter gemeten. Het gebruik van alternatieve instellingen, bv. afhankelijk van het model van de gebruikte luminometer, moet worden gemotiveerd.
29. De parameters voor elke concentratie worden berekend aan de hand van de gemeten waarden, bv. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, het gemiddelde ± SD van IL8LA, het gemiddelde ± SD van GAPLA, het gemiddelde ± SD van nIL8LA, het gemiddelde ± SD van Ind-IL8LA, het gemiddelde ± SD van Inh-GAPLA en het 95 %-betrouwbaarheidsinterval van Ind-IL8LA. Definities van de in dit punt gebruikte parameters zijn te vinden in respectievelijk aanhangsel I en aanhangsel IV.
30. Voorafgaand aan de meting worden kleuren in meerkleurige reporterbepalingen onderscheiden met behulp van detectoren (luminometer en plaatlezer) die zijn uitgerust met optische filters, zoals sharp-cut filters (kortegolf- of langegolf filters) of bandfilters. De transmissiecoëfficiënten van de filters voor elke bioluminescentiesignaalkleur moeten voorafgaand aan het testen worden gekalibreerd, zoals beschreven in aanhangsel 3.2.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Evaluatie van de gegevens

31. Bij de beslissing of een resultaat positief of negatief is, gelden voor elke testrun de volgende criteria:
 - een IL-8 Luc-testvoorspelling wordt positief geacht als een teststof een Ind-IL8LA $\geq 1,4$ heeft en de ondergrens van het 95 %-betrouwbaarheidsinterval van Ind-IL8LA $\geq 1,0$;

- een IL-8 Luc-testvoorspelling wordt negatief geacht als een teststof een Ind-IL8LA $< 1,4$ heeft en de ondergrens van het 95 %-betrouwbaarheidsinterval van Ind-IL8LA $< 1,0$.

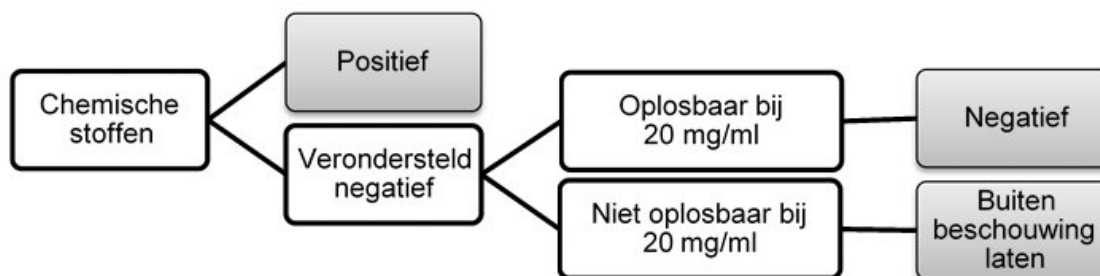
Voorspellingsmodel

32. Teststoffen die twee positieve resultaten opleveren in de 1e, 2e, 3e of 4e testrun, worden aangemerkt als positief, terwijl teststoffen die drie negatieve resultaten opleveren in de 1e, 2e, 3e of 4e testrun, worden aangemerkt als verondersteld negatief (tabel 2). Van de verondersteld negatieve chemische stoffen worden chemische stoffen die bij 20 mg/ml X-VOVO™ 15 oplossen negatief geacht, terwijl chemische stoffen die niet bij 20 mg/ml X-VOVO™ 15 oplossen buiten beschouwing moeten worden gelaten (figuur 1).

Tabel 2: Criteria voor het aanmerken als positief en verondersteld negatief

1e testrun	2e testrun	3e testrun	4e testrun	Uiteindelijke voorspelling
Positief	Positief	-	-	Positief
	Negatief	Positief	-	Positief
		Negatief	Positief	Positief
			Negatief	Verondersteld negatief
Negatief	Positief	Positief	-	Positief
		Negatief	Positief	Positief
	Negatief		Negatief	Verondersteld negatief
		Positief	Positief	Positief
			Negatief	Verondersteld negatief
		Negatief	-	Verondersteld negatief

Figuur 1: Voorspellingsmodel voor uiteindelijk oordeel



Aanvaardbaarheidscriteria

33. Bij gebruik van de IL-8 Luc-bepaling moet aan de volgende aanvaardbaarheidscriteria worden voldaan:

- de Ind-IL8LA moet in elke testrun meer dan 5,0 zijn in ten minste één concentratie van de positieve controle, 4-NBB.
- de Ind-IL8LA moet in elke testrun minder dan 1,4 zijn in ten minste één concentratie van de negatieve controle, melkzuur.
- Gegevens van platen waarvoor de GAPLA van controleputjes met cellen en Tripluc, maar zonder chemische stoffen minder dan 5 maal zo hoog is als de GAPLA van putjes die uitsluitend testmedium bevatten (50 µl/putje 10 % FBS bevattend RPMI-1640 en 50 µl/putje X-VIVO™ 15), moeten worden afgekeurd.
- Gegevens van platen waarvoor de Inh-GAPLA van alle concentraties van de test- of controlestoffen lager is dan 0,05, moeten worden afgekeurd. In dat geval moet de eerste test worden herhaald, zodat de hoogste uiteindelijke concentratie van de herhaalde test de laagste uiteindelijke concentratie van de voorgaande test is.

Testverslag

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

Teststoffen

Stof die uit één component bestaat:

- chemische identificatie, zoals IUPAC- of CAS-na(a)m(en), CAS-nummer(s), SMILES- of InChI-code(s), structuurformules en/of andere identificatiemiddelen;
- fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water, molecuulgewicht en andere relevante fysisch-chemische eigenschappen, voor zover die beschikbaar zijn;
- zuiverheid, chemische naam van onzuiverheden waar passend en praktisch haalbaar enz.;
- behandeling voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);
- oplosbaarheid in X-VIVO™ 15. Voor chemische stoffen die niet oplosbaar zijn in X-VIVO™ 15, ongeacht of na het centrifugeren precipitatie of flotatie wordt waargenomen;
- geteste concentratie(s);
- opslagomstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar;
- motivering van de keuze van het oplosmiddel/vehiculum voor elke teststof, als geen X-VIVO™ 15 is gebruikt.

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;
- fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water en andere relevante fysisch-chemische eigenschappen, voor zover die beschikbaar zijn;
- molecuulgewicht of schijnbaar molecuulgewicht in het geval van mengsels/polymeren waarvan de samenstelling bekend is, of andere informatie die relevant is voor het verloop van de studie;
- behandeling voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);
- oplosbaarheid in X-VIVO™ 15. Voor chemische stoffen die niet oplosbaar zijn in X-VIVO™ 15, ongeacht of na het centrifugeren precipitatie of flotatie wordt waargenomen;
- geteste concentratie(s);
- opslagomstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar.
- motivering van de keuze van het oplosmiddel/vehiculum voor elke teststof, als geen X-VIVO™ 15 is gebruikt.

Controles

Positieve controle:

- chemische identificatie, zoals IUPAC- of CAS-na(a)m(en), CAS-nummer(s), SMILES- of InChI-code(s), structuurformules en/of andere identificatiemiddelen;
- fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water, molecuulgewicht en andere relevante fysisch-chemische eigenschappen, voor zover die beschikbaar zijn en voor zover van toepassing;
- zuiverheid, chemische naam van onzuiverheden waar passend en praktisch haalbaar enz.;
- behandeling voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);
- geteste concentratie(s);
- opslagomstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar;
- verwijzing naar historische positievecontroteresultaten waaruit de geschiktheid van de aanvaardbaarheidscriteria blijkt, indien van toepassing.

Negatieve controle:

- chemische identificatie, zoals IUPAC- of CAS-na(a)m(en), CAS-nummer(s) en/of andere identificatiemiddelen;
- zuiverheid, chemische naam van onzuiverheden waar passend en praktisch haalbaar enz.;

- fysisch voorkomen, molecuulgewicht en andere relevante fysisch-chemische eigenschappen, in het geval er andere negatieve controles worden gebruikt dan diegene die zijn vermeld in deze testmethode, en voor zover beschikbaar;
- opslagomstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar;
- motivering van de keuze van het oplosmiddel voor elke teststof.

Testomstandigheden

- naam en adres van de opdrachtgever, testinstallatie en de onderzoeksleider;
- een beschrijving van de gebruikte test;
- gebruikte cellijn, omstandigheden waarin die werd bewaard en oorsprong (bv. de instelling waarvan de cellijn werd verkregen);
- partijnummer en oorsprong van FBS, naam leverancier, partijnummer van de zwarte 96-putjesplaat met vlakke bodem, en partijnummer van het Tripluc-reagens;
- passagenummer en voor de test gebruikte celdichtheid;
- gebruikte methode voor het tellen van de cellen met het oog op de enting voorafgaand aan de tests en getroffen maatregelen voor een homogene verdeling van het aantal cellen;
- gebruikte luminometer (bv. model), met inbegrip van de instrumentinstellingen, het gebruikte luciferasesubstraat en bewijs van passende luminescentiemetingen op basis van de in aanhangsel 3.2 beschreven controletest;
- gebruikte procedure om aan te tonen dat het laboratorium bekwaam is om de test uit te voeren (bv. door de stoffen voor bekwaamheidstoetsing te testen) of om aan te tonen dat de resultaten van de test in de loop van de tijd kunnen worden gereproduceerd.

Werkwijze

- het aantal duplo's en testruns;
- de concentraties van de teststof, gebruikte procedure voor het opbrengen en blootstellingstijd (indien verschillend van wat is aanbevolen);
- een beschrijving van de gebruikte beoordelings- en beslissingscriteria;
- een beschrijving van de gebruikte criteria voor de aanvaardbaarheid van tests;
- een beschrijving van eventuele modificaties van de testprocedure.

Resultaten

- IL8LA- en GAPLA-metingen;
- berekeningen voor nIL8LA, Ind-IL8LA en Inh-GAPLA;

- het 95 %-betrouwbaarheidsinterval van Ind-IL8LA;
- een grafiek met de dosis-responscurves voor inductie van luciferaseactiviteit en levensvatbaarheid;
- een beschrijving van eventuele andere relevante waarnemingen.

Bespreking van de resultaten

- bespreking van de resultaten verkregen met de IL-8 Luc-bepaling;
- overweging van de resultaten van de bepaling in de context van een IATA, als er andere relevante informatie beschikbaar is.

Conclusie

LITERATUUR

- (1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci* 124:359-69.
- (2) OESO (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs. Beschikbaar op: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (3) OESO (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs. Beschikbaar op: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (4) OESO (2016). Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs. Beschikbaar op: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:371-9.
- (6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29:1816-30.
- (7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71:337-51.
- (8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation

test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

- (9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147-155.
- (10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.
- (11) OESO (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Parijs. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>.
- (12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.
- (13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.
- (14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.
- (15) OESO (2017). Nog niet gepubliceerd - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OESO, Parijs, Frankrijk
- (16) OESO (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 34. OESO, Parijs, Frankrijk.
- (17) OESO (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs. Beschikbaar op: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD%20Final%20Draft%20GIVIMP.pdf).

- (18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Available at. http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.
- (19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochem Photobiol* 86:1046-9.
- (20) OESO (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OESO, Parijs, Frankrijk.
- (21) Verenigde Naties (2015). Mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen (GHS). Zesde herziene editie. 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.

Aanhangsel 3.1

DEFINITIES

AOP (Adverse Outcome Pathway): een reeks gebeurtenissen van de chemische structuur van een doelstof of een groep soortgelijke chemische stoffen, van de moleculaire inleidende gebeurtenis tot een te onderzoeken in-vivoresultaat (20).

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een test, 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 (16).

Chemische stof: een stof of een mengsel.

CV05: cellevensvatbaarheid 05, d.w.z. de minimale concentratie waarbij chemische stoffen een Inh-GAPLA van minder dan 0,05 vertonen.

FInSLO-LA: in het valideringsrapport en eerdere publicaties over de IL-8 Luc-bepaling gebruikte afkorting waarmee Ind-IL8LA bedoeld wordt. Zie Ind-IL8LA voor de definitie.

GAPLA: Luciferase-activiteit van Stable Luciferase Red (SLR) ($\lambda_{\text{max}} = 630 \text{ nm}$), gereguleerd door GAPDH-promotor, toont cellevensvatbaarheid en het aantal levensvatbare cellen aan.

Geldige testmethode: een test 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.

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. Het is een maat voor de nauwkeurigheid van een test die categorale resultaten oplevert en is een belangrijke overweging bij de beoordeling van de relevantie van een test (16).

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 (21).

IATA (Integrated Approach on Testing and Assessment, geïntegreerde test- en beoordelingsbenadering): een gestructureerde aanpak die wordt gebruikt voor de identificatie van gevaren (potentieel), het kenmerken van gevaren (potentie) en/of het beoordelen van de veiligheid (potentieel/potentie en blootstelling) van een chemische stof of een groep chemische stoffen, waarbinnen alle relevante gegevens strategisch worden geïntegreerd en worden afgewogen als inbreng voor regelgevingsbesluiten inzake potentiële gevaren en/of risico's en/of de noodzaak van verdere gerichte en bijgevolg minimale tests.

IL-8 (interleukine-8): een cytokine die wordt geproduceerd door endotheelcellen, fibroblasten, keratinocyten, macrofagen en monocysten, en die chemotaxis van neutrofielen en T-celmyfocyten veroorzaakt.

IL8LA: luciferase-activiteit van Stable Luciferase Orange (SLO) ($\lambda_{\text{max}} = 580 \text{ nm}$), gereguleerd door IL-8-promotor.

II-SLR-LA: in het valideringsrapport en eerdere publicaties over de IL-8 Luc-bepaling gebruikte afkorting waarmee Inh- GAPLA bedoeld wordt. Zie Inh-GAPLA voor de definitie.

Ind-IL8LA: x-voudige inductie van IL8LA. De Ind-IL8LA wordt verkregen door de nIL8LA van THP-G8-cellen die met chemische stoffen zijn behandeld, te delen door de nIL8LA van niet-gestimuleerde THP-G8-cellen, en staat voor de inductie van IL-8-promotoractiviteit door chemische stoffen.

Inh-GAPLA: remming van GAPLA. De Inh-GAPLA wordt verkregen door de GAPLA van THP-G8-cellen die met chemische stoffen zijn behandeld, te delen door de GAPLA van niet-behandelde THP-G8-cellen, en staat voor de cytotoxiciteit van chemische stoffen.

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

Minimale drempelwaarde voor inductie (MIT, minimum induction threshold): de laagste concentratie waarbij een chemische stof voldoet aan de positieve criteria.

Nauwkeurigheid: de mate van overeenstemming tussen testresultaten en erkende referentiewaarden. Het is een maat voor de prestaties van de test en één aspect van relevantie. Deze term en de term "concordantie", waaronder het percentage correcte uitkomsten van een test wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt (16).

nIL8LA: de SLO-luciferase-activiteit die de activiteit van IL-8-promotor (IL8LA) weerspiegelt, genormaliseerd door de SLR-luciferase-activiteit die de activiteit van GAPDH-promotor (GAPLA) weerspiegelt. nIL8LA staat voor de activiteit van IL-8-promotor met inachtneming van de cellevensvatbaarheid en het aantal cellen.

nSLO-LA: in het valideringsrapport en eerdere publicaties over de IL-8 Luc-bepaling

gebruikte afkorting waarmee nIL8LA bedoeld wordt. Zie nIL8LA voor de definitie.

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 positievecontrole respons in de loop van de tijd kan worden beoordeeld, mag de grootte van de positieve respons niet buitensporig zijn.

Prehaptenen: chemische stoffen die in sensibiliserende stoffen veranderen na abiotische transformatie.

Prohaptenen: chemische stoffen die enzymatische activering nodig hebben om hun potentieel voor huidsensibilisatie te realiseren.

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 test (16).

Oplosmiddel-/vehiculumcontrole: een onbehandeld monster dat alle componenten bevat van een testsysteem met uitzondering van de teststof, maar met inbegrip van het gebruikte oplosmiddel/vehiculum. Dit monster wordt gebruikt om de referentierespons vast te stellen voor de monsters die worden behandeld met de in hetzelfde oplosmiddel/vehiculum opgeloste of stabiel gedispergeerde teststof. Als dit monster getest wordt met een tegelijkertijd gemeten mediumcontrole, toont het ook aan of het oplosmiddel/vehiculum met het testsysteem interageert.

Oppervlakteactieve stof: ook "agens dat inwerkt op de oppervlakte" genoemd. Dit is een 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 bevochtigmiddel. (TG437)

SLO-LA: in het valideringsrapport en eerdere publicaties over de IL-8 Luc-bepaling gebruikte afkorting waarmee IL8LA bedoeld wordt. Zie IL8LA voor de definitie.

SLR-LA: in het valideringsrapport en eerdere publicaties over de IL-8 Luc-bepaling gebruikte afkorting waarmee GAPLA bedoeld wordt. Zie GAPLA voor de definitie.

Specificiteit: het percentage van alle negatieve/niet-actieve chemische stoffen dat door middel van de testmethode correct wordt ingedeeld. Het is een maat voor de nauwkeurigheid van een test die categorale resultaten oplevert en is een belangrijke overweging bij de beoordeling van de relevantie van een test (16).

Stof: een chemisch element en de verbindingen ervan, zoals zij in natuurlijke toestand voorkomen of bij productie of vervaardiging ontstaan, met inbegrip van alle additieven die nodig zijn om de stabiliteit van dat product te behouden en alle onzuiverheden ten gevolge van het toegepaste procedé, maar met uitzondering van elk oplosmiddel dat kan worden

afgescheiden zonder de stabiliteit van de stof aan te tasten of de samenstelling ervan te wijzigen.

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 van haar hoofdcomponenten aanwezig is in een concentratie van ≥ 10 % (g/g) en < 80 % (g/g). 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 methode geteste stoffen of mengsels.

Testrun: een testrun bestaat uit het gelijktijdig testen van een of meer chemische stoffen met een oplosmiddel-/vehiculumcontrole en met een positieve controle.

THP-G8: een IL-8-reportercellijn die in de IL-8 Luc-bepaling wordt gebruikt. De humane macrofaagachtige cellijn THP-1 werd getransfecteerd met de SLO- en SLR-luciferasegenen onder controle van respectievelijk de IL-8- en GAPDH-promotors.

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

Aanhangsel 3.2

PRINCIPE VAN HET METEN VAN LUCIFERASE-ACTIVITEIT EN VAN HET BEPALEN VAN DE TRANSMISSIECOËFFICIËNTEN VAN HET FILTER VOOR SLO EN SLR

MultiReporter Assay System Tripluc kan worden gebruikt in combinatie met een microplaat-luminometer met een detectiesysteem voor meerdere kleuren, dat kan worden uitgerust met een optisch filter (bv. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer) of Tristar LB941 (Berthold)). Het optisch filter dat bij de meting wordt gebruikt, is een 600-620 nm langegolf- of kortegolffilter of een 600-700 nm bandfilter.

Meting met een optisch filter van luciferasen die twee kleuren uitzenden.

In dit voorbeeld wordt gebruikgemaakt van Phelios AB-2350 (ATTO). Deze luminometer is uitgerust met een 600 nm langegolffilter ("long pass"- filter, hierna "600 nm LP" genoemd) (R60 HOYA Co., filter 1) voor het splitsen van de luminescentie van SLO ($\lambda_{\max} = 580$ nm) en SLR ($\lambda_{\max} = 630$ nm).

Om de transmissiecoëfficiënten van 600 nm LP te bepalen, moet met behulp van gezuiverde SLO- en SLR-luciferasen het volgende worden gedaan: i) meet de intensiteit van de SLO- en SLR-bioluminescentie zonder filter (F0), ii) meet de intensiteit van de SLO- en SLR-bioluminescentie die 600 nm LP (filter 1) is gepasseerd, en iii) bereken de onderstaande transmissiecoëfficiënten van 600 nm LP voor SLO en SLR.

Transmissiecoëfficiënten		Afkorting	Definitie
SLO	Transmissie-coëfficiënten filter 1	$\kappa_{O_{R60}}$	Transmissiecoëfficiënt van het filter voor SLO
SLR	Transmissie-coëfficiënten filter 1	$\kappa_{R_{R60}}$	Transmissiecoëfficiënt van het filter voor SLR

Wanneer de intensiteit van SLO en SLR in het testvoorbeeld worden gedefinieerd als respectievelijk O en R, worden i) de intensiteit van licht zonder filter (volledig optisch) F0 en ii) de intensiteit van licht dat wordt doorgelaten door 600 nm LP (filter 1) F1 als volgt beschreven:

$$F0 = O + R$$

$$F1 = \kappa_{O_{R60}} \times O + \kappa_{R_{R60}} \times R$$

Deze formules kunnen als volgt worden geherformuleerd:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Vervolgens kan de O- en R-waarde, met behulp van de berekende transmissiefactoren (κO_{R60} en κR_{R60}) en de gemeten F0 en F1, als volgt worden berekend:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Materialen en methoden voor het bepalen van de transmissiefactor

1) Reagentia

Enkelvoudige, gezuiverde luciferase-enzymen:

Gevriesdroogd, gezuiverd SLO-enzym

Gevriesdroogd, gezuiverd SLR-enzym

(die met het oog op de valideringswerkzaamheden zijn gekocht bij GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan, met THP-G8-cel lijn)

Testreagens:

Tripluc® Luciferase Assay Reagent (bv. van TOYOBO Cat. nr. MRA-301)

Medium: voor luciferasebepaling (30 ml, bewaard bij 2-8 °C)

Reagens	Conc.	Uiteindelijke conc. in medium	Vereiste hoeveelheid
RPMI-1640	-	-	27 ml
FBS	-	10 %	3 ml

2) Bereiding van de enzymoplossing

Los gevriesdroogd, gezuiverd luciferase-enzym op in een buisje door 200 µl toe te voegen van 10 ~ 100 mM Tris/HCl of Hepes/HCl (pH 7,5 ~ 8,0) aangevuld met 10 % (w/v) glycerol, verdeel de enzymoplossing in aliquots van 10 µl in wegwerpbuisjes van 1,5 ml en sla ze op in een vriezer bij -80 °C. De bevroren enzymoplossing kan maximaal 6 maanden worden gebruikt. Voeg bij gebruik 1 ml medium voor luciferasebepalingen (RPMI-1640 met 10 % FBS) toe aan elk buisje met de enzymoplossing (verdunde enzymoplossing) en plaats ze op ijs om deactivering te voorkomen.

3) Bioluminescentiemeting

Ontdooi de Tripluc[®] Luciferase Assay Reagent en bewaar bij kamertemperatuur ofwel in een waterbad ofwel in een ruimte waarin de lucht op kamertemperatuur is. Laat de luminometer gedurende 30 minuten opstarten alvorens te beginnen met de meting, zodat de fotomultiplicator kan stabiliseren. Breng 100 µl van de verdunde enzymoplossing over naar een zwarte plaat met 96 putjes met vlakke bodem (het SLO-referentiemonster naar nr. B1, nr. B2 en nr. B3, en het SLR-referentiemonster naar nr. D1, nr. D2 en nr. D3). Breng vervolgens met behulp van een Pipetman[®] 100 µl voorverwarmde Tripluc over in elk van de putjes met de verdunde enzymoplossing. Schud de plaat gedurende 10 minuten bij kamertemperatuur (ongeveer 25 °C) in een plaatschudder. Verwijder eventuele luchtbellens uit de oplossingen in de putjes. Zet de plaat in de luminometer om de luciferase-activiteit te meten. De bioluminescentie wordt gedurende 3 seconden zonder (F0) en 3 seconden met (F1) het optisch filter gemeten.

De transmissiecoëfficiënt van het optisch filter wordt als volgt berekend:

Transmissiecoëfficiënt (SLO ($\kappa_{O_{R60}}$)) = (nr. B1 van F1 + nr. B2 van F1 + nr. B3 van F1) / (nr. B1 van F0 + nr. B2 van F0 + nr. B3 van F0)

Transmissiecoëfficiënt (SLR ($\kappa_{R_{60}}$)) = (nr. D1 van F1 + nr. D2 van F1 + nr. D3 van F1) / (nr. D1 van F0 + nr. D2 van F0 + nr. D3 van F0)

De berekende transmissiefactoren worden gebruikt voor alle met dezelfde luminometer uitgevoerde metingen.

Kwaliteitscontrole van de apparatuur

De procedures die worden beschreven in het IL-8 Luc-protocol moeten worden gevolgd (18).

Aanhangsel 3.3

STOFFEN VOOR BEKWAAMHEIDSTOETSING

Vooraleer over te gaan tot routinegebruik van de onder testmethode B.71 vallende test die in dit aanhangsel wordt beschreven, moeten laboratoria hun technische bekwaamheid aantonen door de verwachte IL-8 Luc-voorspelling te verkrijgen voor de 10 stoffen die in tabel 1 worden aanbevolen, en door de waarden te verkrijgen die binnen de respectieve referentiebereiken vallen voor ten minste 8 van de 10 stoffen voor bekwaamheidstoetsing (zodanig geselecteerd dat ze alle mogelijke responsen voor huidsensibilisatiegevaar weerspiegelen). Andere selectiecriteria waren dat stoffen in de handel beschikbaar zijn, en dat er in-vivoreferentiegegevens en met de IL-8 Luc-bepaling gegenereerde in-vitrogegevens van zeer goede kwaliteit beschikbaar zijn. Voor de IL-8 Luc-bepaling zijn tevens gepubliceerde referentiegegevens beschikbaar (6) (1).

Tabel 1: Aanbevolen stoffen voor het aantonen van technische bekwaamheid met de IL-8 Luc-bepaling

Stoffen voor bekwaamheidstoetsing	CAS-nr.	Toestand	Oplosbaarheid in X-VIVO15 bij 20 mg/ml	In-vivo voorspelling ¹	IL-8 Luc-voorspelling ²	Referentiebereik (µg/ml) ³	
						CV05 ⁴	IL-8 Luc MIT ⁵
2,4-Dinitrochlorbenzeen	97-00-7	Vaste stof	Onoplosbaar	Sensibiliserend (extreem)	Positief	2,3-3,9	0,5-2,3
Formaldehyde	50-00-0	Vloeistof	Oplosbaar	Sensibiliserend (sterk)	Positief	9-30	4-9
2-Mercaptobenzothiazol	149-30-4	Vaste stof	Onoplosbaar	Sensibiliserend (matig)	Positief	250-290	60-250
Ethyleendiamine	107-15-3	Vloeistof	Oplosbaar	Sensibiliserend (matig)	Positief	500-700	0,1-0,4
Ethyleenglycol-dimethacrylaat	97-90-5	Vloeistof	Onoplosbaar	Sensibiliserend (zwak)	Positief	> 2 000	0,04-0,1
4-Allylanisol (estragol)	140-67-0	Vloeistof	Onoplosbaar	Sensibiliserend (zwak)	Positief	> 2 000	0,01-0,07
Streptomycinesulfaat	3810-74-0	Vaste stof	Oplosbaar	Niet-sensibiliserend	Negatief	> 2 000	> 2 000
Glycerol	56-81-5	Vloeistof	Oplosbaar	Niet-sensibiliserend	Negatief	> 2 000	> 2 000
Propaan-2-ol	67-63-0	Vloeistof	Oplosbaar	Niet-sensibiliserend	Negatief	> 2 000	> 2 000

Afkortingen: CAS-nummer = registratienummer van de Chemical Abstracts Service.

¹ De in-vivopotentie wordt afgeleid met behulp van de criteria die zijn voorgesteld door ECETOC (19).

² Op basis van in het verleden waargenomen waarden (1) (6).

³ CV05 en IL-8 Luc MIT zijn berekend aan de hand van de oplosbaarheid in water volgens EPI Suite™.

⁴ CV05: de minimale concentratie waarbij chemische stoffen een Inh-GAPLA van minder dan 0,05 vertonen.

⁵ MIT: de laagste concentraties waarbij een chemische stof voldoet aan de positieve criteria.

Aanhangsel 3.4

INDEXEN EN BEOORDELINGSCRITERIA

nIL8LA (nSLO-LA)

De j-e herhaling ($j = 1-4$) van de i-e concentratie ($i = 0-11$) wordt gemeten voor respectievelijk IL8LA (SLO-LA) en GAPLA (SLR-LA). De genormaliseerde IL8LA wordt weergegeven als nIL8LA (nSLO-LA) en wordt als volgt gedefinieerd:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij} / GAPLA_{ij}$$

Dit is de basismeeteenheid in deze bepaling.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

De primaire meting van deze bepaling is de verhouding tussen de factor waarmee de gemiddelde nIL8LA (nSLO-LA) voor de herhaling bij de i-e concentratie toeneemt, en die bij de concentratie 0, Ind-IL8LA. Deze verhouding wordt weergegeven door de volgende formule:

$$Ind - IL8LA_i = \{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij}\} / \{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j}\}$$

Het eerstverantwoordelijke laboratorium heeft voorgesteld dat een waarde van 1,4 overeenkomt met een positief resultaat voor de geteste chemische stof. Die waarde is gebaseerd op het onderzoek van de historische gegevens van het eerstverantwoordelijke laboratorium. Vervolgens heeft het team Gegevensbeheer in alle stadia van de valideringsstudie gebruikgemaakt van die waarde. De primaire uitkomst, Ind-IL8LA, is de verhouding van twee rekenkundige gemiddelden zoals in de vergelijking is weergegeven.

95 % betrouwbaarheidsinterval (95 %-BI)

Het 95 % betrouwbaarheidsinterval (95 %-BI) op basis van de verhouding kan worden geschat om te laten zien hoe nauwkeurig de uitkomst van deze primaire meting is. De ondergrens van het 95 %-BI ≥ 1 geeft aan dat de nIL8LA met de i-e concentratie significant groter is dan die voor controle met oplosmiddel. Er zijn diverse manieren om het 95 %-BI te construeren. Wij hebben daarvoor in dit onderzoek gebruik gemaakt van de methode die bekendstaat als de stelling van Fieller. Deze stelling over het 95 %-BI wordt verkregen met de volgende formule:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A} \right],$$

waarbij:

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0,975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}, \quad B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}, \quad C = \bar{y}_i^2 - t_{0,975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ en } n_0 = 4,$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j n_{IL8LA_{0j}}, \quad sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (n_{IL8LA_{0j}} - \bar{x}_0)^2,$$

$$n_{yi} = 4, \quad \bar{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (n_{IL8LA_{ij}}), \quad sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yi} - 1)\} \times \sum_j (n_{IL8LA_{ij}} - \bar{y}_i)^2.$$

$t_{0,975(v)}$ het 97,5 percentiel is van de centrale t-verdeling met v als vrijheidsgraad, met

$$v = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0} \right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

De Inh-GAPLA is een verhouding van de gemiddelde GAPLA (SLR-LA) voor de herhaling van de i-e concentratie vergeleken met die van de controlegroep met oplosmiddel, en wordt geschreven als

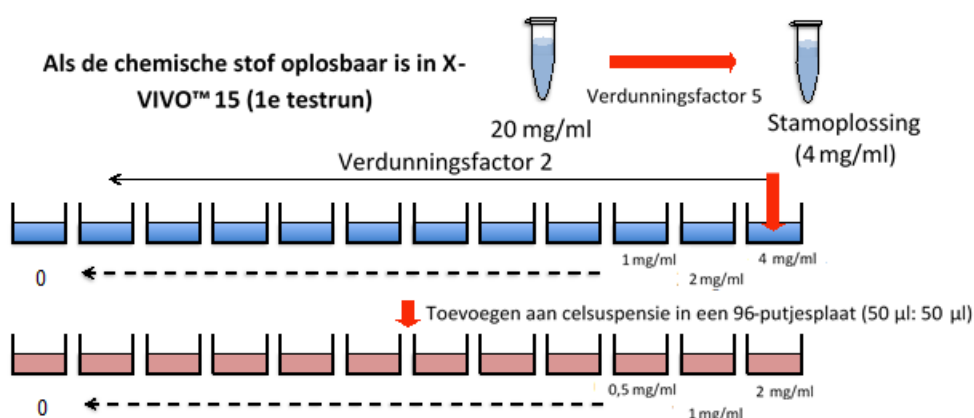
$$Inh - GAPLA_i = \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij}\} / \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j}\}.$$

Aangezien de GAPLA de noemer van de nIL8LA is, geeft een zeer kleine waarde een grote verandering van de nIL8LA. Daarom zouden Ind-IL8LA-waarden met een zeer kleine waarde van Inh-GAPLA (minder dan 0,05) kunnen worden gezien als onnauwkeurig.

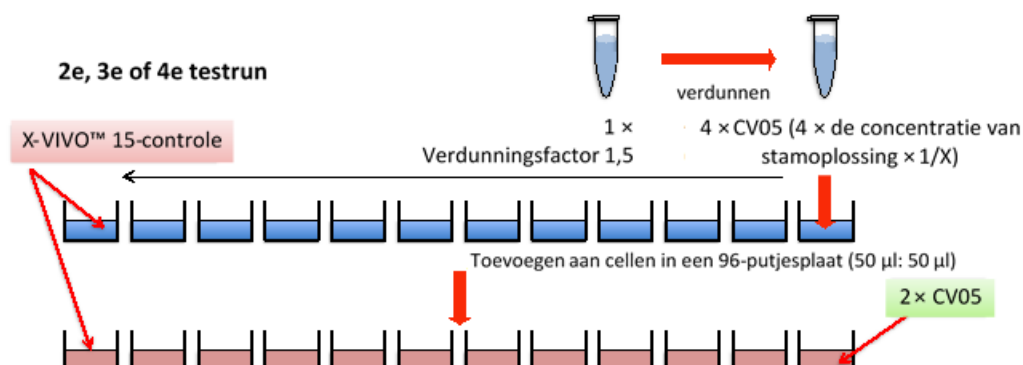
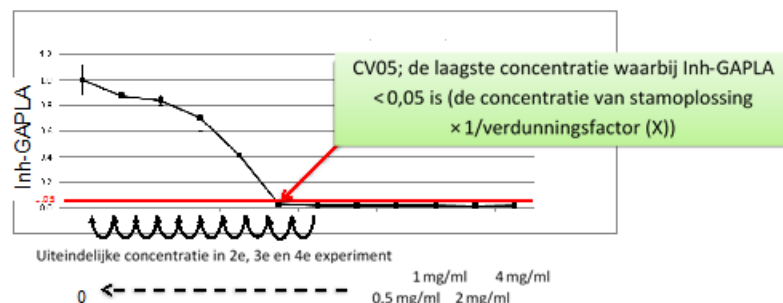
Aanhangsel 3.5

HET SCHEMA VAN DE METHODEN OM CHEMISCHE STOFFEN OP TE LOSSEN VOOR DE IL-8 LUC-BEPALING.

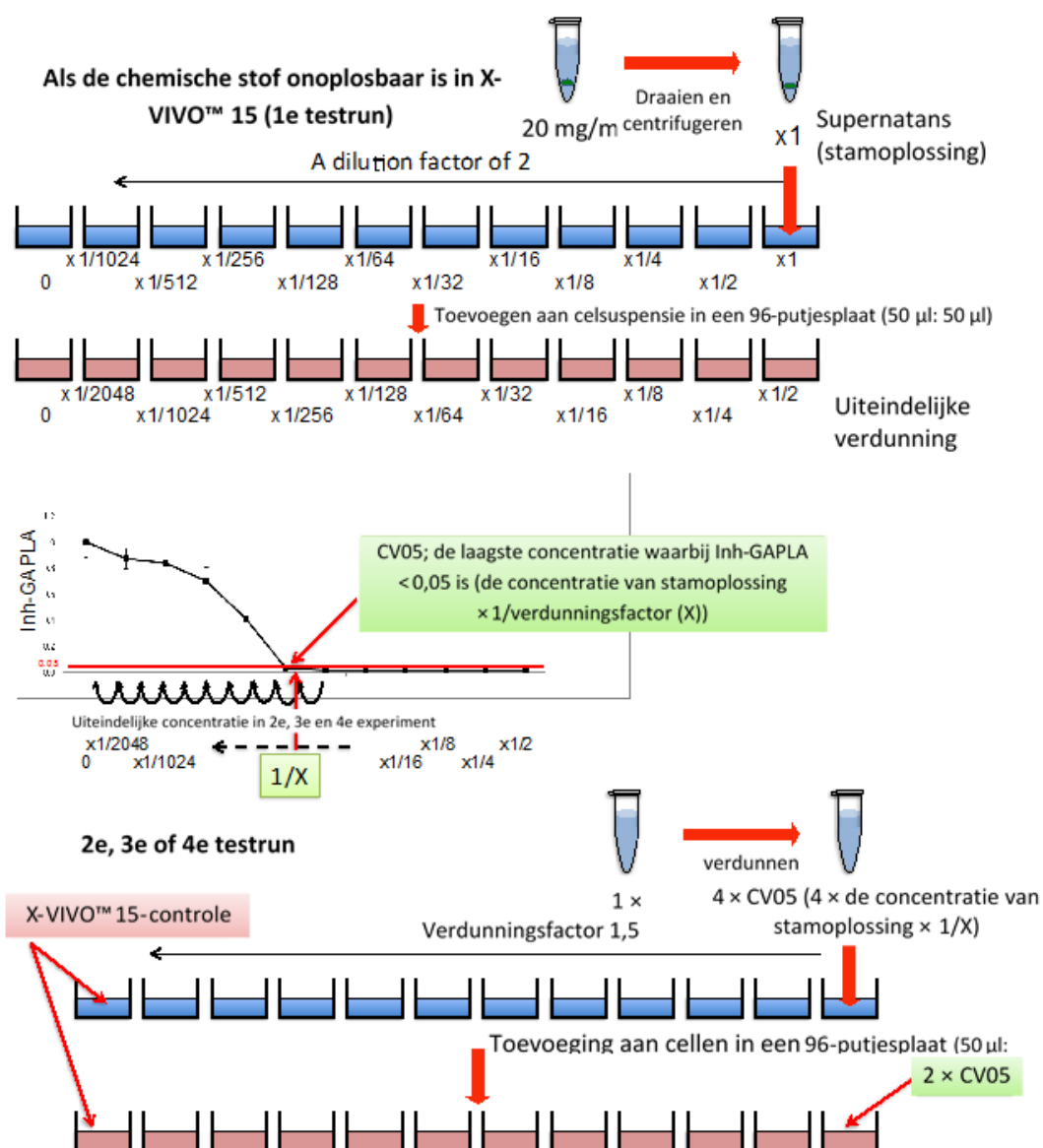
a) Voor chemische stoffen die bij 20 mg/ml oplosbaar zijn in X-VIVO™ 15:



Bepaal de hoogste concentratie van de volgende experimenten

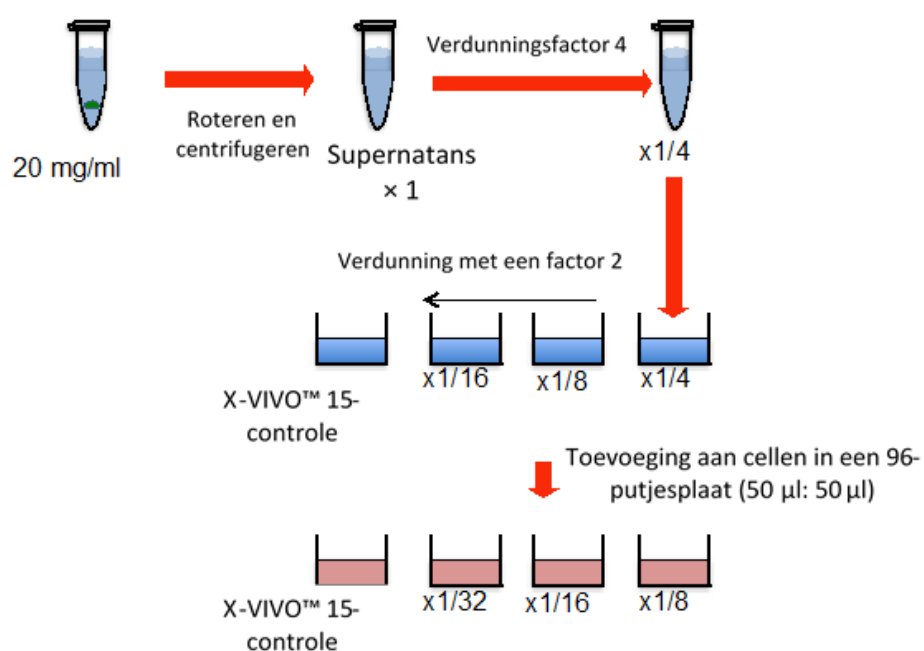


b) Voor chemische stoffen die bij 20 mg/ml onoplosbaar zijn in X-VIVO™ 15:



Aanhangsel 3.6**HET SCHEMA VAN DE METHODE OM 4-NBB OP TE LOSSEN VOOR DE POSITIEVE CONTROLE VAN DE IL-8 LUC-BEPALING.**

De positieve controle: 4-NBB (onoplosbaar in X-VIVO™ 15)



9) In deel C worden de volgende hoofdstukken toegevoegd:

"C.52 REPRODUCTIETEST MET JAPANESE RIJSTVISJES OVER MEERDERE GENERATIES (MEDAKA EXTENDED ONE GENERATION REPRODUCTION TEST – MEOGRT)

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 240 (2015) van de OESO. De MEOGRT is een uitgebreide testmethode waarbij vissen over meerdere generaties worden blootgesteld om gegevens te verkrijgen voor de beoordeling van het milieugevaar en de risico's van chemische stoffen, met inbegrip van chemische stoffen waarvan wordt vermoed dat ze hormoonontregelende stoffen zijn. De blootstelling in het kader van de MEOGRT houdt aan tot het moment van uitkomen (tot twee weken na bevruchting, wpf) in de tweede (F2) generatie. Er zou aanvullend onderzoek moeten worden gedaan om vast te stellen of het nut heeft de F2-generatie ook bloot te stellen na het uitkomen; op dit moment is er onvoldoende informatie die duidt op relevante omstandigheden of criteria om langere blootstelling van de F2-generatie te onderbouwen. Het is echter mogelijk dat deze testmethode wordt bijgewerkt, naarmate nieuwe informatie en gegevens in overweging worden genomen. Zo zouden richtsnoeren over verlenging van de blootstelling van de F2-generatie tot en met de voortplanting onder bepaalde omstandigheden nuttig kunnen zijn (bv. chemische stoffen met een sterk bioconcentratiegedrag of aanwijzingen van transgenerationele effecten in andere taxa). Deze testmethode is geschikt om de mogelijke chronische effecten van chemische stoffen, met inbegrip van potentieel hormoonontregelende stoffen, op vissen te beoordelen. De methode legt primair de nadruk op mogelijke voor de populatie belangrijke effecten (namelijk schadelijke gevolgen voor overleving, ontwikkeling, groei en voortplanting) op de berekening van een concentratie waarbij geen effect wordt waargenomen (No Observed Effect Concentration, NOEC), of een concentratie waarbij een effect wordt waargenomen (Effect Concentration, ECx). Opgemerkt zij evenwel dat ECx-benaderingen zich zelden lenen voor dit soort grote onderzoeken waarbij het soms ondoenlijk is het aantal testconcentraties te verhogen om de gewenste ECx te kunnen bepalen, en waarbij tevens het dierenwelzijn in het gedrang kan komen vanwege het grote aantal dieren dat wordt gebruikt. Voor chemische stoffen die geen beoordeling over meerdere generaties vereisen, of chemische stoffen waarvoor geen vermoeden van hormoonontregelende effecten bestaat, zijn andere testmethoden mogelijk beter geschikt (1). Het Japanse rijstvisje is de aangewezen soort voor deze testmethode, gezien de korte levenscyclus en de mogelijkheid het genetisch geslacht ervan te bepalen (2), hetgeen wordt gezien als essentieel onderdeel van deze testmethode. De specifieke methoden en gemeten eindpunten die in deze testmethode worden beschreven, gelden

alleen voor het Japanse rijstvisje. Andere kleine vissoorten (bv. de zebravis) zijn mogelijk geschikt voor een vergelijkbaar testprotocol.

2. In deze testmethode wordt een aantal biologische eindpunten gemeten. De aandacht richt zich in de eerste plaats op potentiële nadelige effecten op voor de populatie belangrijke parameters, zoals overleving, macroscopische ontwikkeling, groei en voortplanting. Ten tweede, om mechanistische informatie te verkrijgen en een verband te leggen tussen uitkomsten van andere soorten veld- en laboratoriumonderzoek waaruit achteraf is gebleken dat een chemische stof mogelijk hormoonontregelende effecten vertoont (bv. androgene of oestrogene activiteit in andere tests en bepalingen), wordt andere nuttige informatie verkregen door meting van *vitellogenine* (*vtg*)-mRNA (of het eiwit vitellogenine, VTG), fenotypische secundaire geslachtskenmerken (SSC) in samenhang met genetisch geslacht, en door beoordeling van de histopathologie. Opgemerkt zij, dat meting van deze secundaire eindpunten mogelijk niet nodig is, als er voor een teststof of de metabolieten daarvan geen vermoeden van hormoonontregelende effecten bestaat, zodat in dat geval onderzoek met minder middelen en dieren mogelijk beter geschikt is (1). De in deze testmethode gebruikte definities staan in aanhangsel 1.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

3. Omdat er bij de validering van deze tamelijk complexe test slechts een beperkt aantal stoffen is getest en een beperkt aantal laboratoria betrokken was, wordt verwacht dat, zodra er voldoende onderzoeken beschikbaar zijn om zekerheid te krijgen over het effect van deze nieuwe onderzoeksopzet, de testmethode opnieuw tegen het licht zal worden gehouden en zo nodig zal worden herzien in het licht van de opgedane ervaringen. De gegevens kunnen worden gebruikt op niveau 5 van het conceptueel kader van de OESO voor het testen en beoordelen van hormoonontregelende chemische stoffen (3). De testmethode begint met het blootstellen van volwassenen vissen (de F0-generatie) aan de teststof tijdens de voortplantingsfase. De blootstelling houdt aan tijdens de ontwikkeling en voortplanting van de F1-generatie en duurt tot en met het uitkomen van de F2-generatie; op die manier is het mogelijk om zowel structurele als activerende endocriene wegen te beoordelen. De met hormonen samenhangende eindpunten kunnen worden geïnterpreteerd volgens een op bewijskracht gebaseerde benadering.
4. Enerzijds moet het aantal proefdieren voldoende zijn om de bewijskracht te verkrijgen die nodig is om voor de voortplanting relevante eindpunten te beoordelen (zie aanhangsel 3), terwijl het met het oog op dierenwelzijn anderzijds zo laag mogelijk moet blijven. Aangezien er grote aantallen dieren worden gebruikt, is het belangrijk de noodzaak van de test zorgvuldig af te wegen tegen bestaande gegevens die mogelijk al relevante informatie

over veel van de eindpunten in de MEOGRT bevatten. In dit opzicht wordt voor hulp verwezen naar het OESO-kader voor toxiciteitstests bij vissen (1).

5. De testmethode is in de eerste plaats ontworpen om de effecten van één stof te onderscheiden. Als er evenwel moet worden getest met een mengsel, moet worden overwogen of de testresultaten wel aanvaardbaar zullen zijn voor het beoogde regelgevingsdoel.
6. Alvorens met de test wordt begonnen, is het van belang om over informatie te beschikken over de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof, met name voor het aanmaken van stabiele chemische oplossingen. Ook moet er een voldoende gevoelige analysemethode voorhanden zijn om de teststofconcentraties te verifiëren.

PRINCIPE VAN DE TEST

7. De test begint met de blootstelling gedurende drie weken van geslachtsrijpe mannetjes en vrouwtjes (ten minste 12 wpf) in broedpaartjes; in die periode verspreidt de teststof zich in het organisme van de oudergeneratie (F0) volgens het toxicokinetische gedrag van de stof. Zo kort mogelijk voor de eerste dag van de vierde week worden er eitjes verzameld om de F1-generatie te beginnen. Tijdens de ontwikkeling van de F1-generatie (in totaal 15 weken) worden uitkomen en overleven beoordeeld. Daarnaast worden 9-10 wpf monsters van de vissen genomen voor ontwikkelingseindpunten en wordt 12-14 wpf drie weken lang het kuitschieten beoordeeld. Na de derde week van de beoordeling van de voortplanting wordt er begonnen met een F2-generatie, die wordt opgekweekt tot alle eitjes zijn uitgekomen.

GELDIGHEIDSCRITERIA VOOR DE TEST

8. Voor de geldigheid van de test zijn de volgende criteria van toepassing:
 - het gehalte aan opgeloste zuurstof moet gedurende de gehele test ≥ 60 % van de verzadigingswaarde van lucht bedragen;
 - de gemiddelde watertemperatuur gedurende het gehele onderzoek moet tussen 24 en 26 °C zijn. Kortstondige afwijkingen van het gemiddelde in afzonderlijke aquaria mogen niet meer dan 2 °C bedragen;
 - de gemiddelde fecunditeit van de controlegroepen in elk van beide generaties (F0 en F1) moet groter zijn dan 20 eitjes per paar per dag. De fertiliteit van alle tijdens de beoordeling geproduceerde eitjes moet groter zijn dan 80 %. Verder moeten 16 van de aanbevolen 24 broedpaartjes in de controlegroepen (> 65 %) meer dan 20 eitjes per paar per dag produceren;

- het uitkomstpercentage van de eitjes moet ≥ 80 % (gemiddeld) zijn in de controlegroepen (in zowel de F1- als de F2-generatie);
- overleving na uitkomen tot 3 wpf en van 3 wpf tot einde voor de F1-generatie (d.w.z. 15 wpf) moet ≥ 80 % (gemiddeld) respectievelijk ≥ 90 % (gemiddeld) zijn in de controlegroepen (F1);
- er moet bewijs beschikbaar zijn waaruit blijkt dat de gehalten aan teststof in de oplossing binnen ± 20 % van de gemiddelde gemeten waarden zijn gehouden.

Hoewel dit geen geldigheids criterium is, mogen duplo's binnen een behandelde groep ten aanzien van de watertemperatuur statistisch niet van elkaar verschillen en mogen behandelde groepen binnen de test statistisch niet van elkaar verschillen (op basis van dagelijkse temperatuurmeting en met uitzondering van kortstondige afwijkingen).

9. Het kan zijn dat in de groepen met meer blootstelling minder voortplanting wordt waargenomen, maar op zijn minst moet in de groep met de op twee na hoogste blootstelling en alle groepen met een lagere blootstelling van F0 de voortplanting voldoende zijn om de incubatoren te vullen. Verder moet in de groep met de op twee na hoogste blootstelling en alle groepen met een lagere blootstelling van F1 de embryonale overleving voldoende zijn om eindpuntbeoordeling mogelijk te maken in monsters van subvolwassen vissen (zie de punten 36 en 38 en aanhangsel 9). Daarnaast moet er in de uitgekomen eitjes in de groep met de op een na hoogste blootstelling van F1 ten minste sprake zijn van minimale overleving (~ 20 %). Dit zijn op zich geen geldigheids criteria maar aanbevelingen om de berekening van robuuste NOEC's mogelijk te maken.
10. Als er een afwijking van de aanvaardbaarheids criteria voor de test wordt waargenomen, moeten de gevolgen wat betreft de betrouwbaarheid van de testresultaten in overweging worden genomen en moeten deze afwijkingen en overwegingen in het testverslag worden opgenomen.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Apparatuur

11. Standaardlaboratoriumapparatuur, met name:

- a) zuurstof- en pH-meters;
- b) apparatuur voor het bepalen van de hardheid en alkaliteit van water;
- c) geschikte apparatuur voor de temperatuurregeling en bij voorkeur ook voor continue bewaking;
- d) bakken van chemisch inert materiaal met een inhoud die geschikt is voor de aanbevolen dichtheid en bezettingsgraad (zie aanhangsel 3);

e) weegschaal met een toereikende nauwkeurigheid (d.w.z. nauwkeurig tot op $\pm 0,5$ mg).

Water

12. Water waarin de gekozen testsoort langdurig kan overleven en groeien is geschikt als testwater. Gedurende de testperiode moet de waterkwaliteit constant zijn. Om ervoor te zorgen dat het verdunningswater de testresultaten niet noemenswaardig beïnvloedt (bijvoorbeeld door complexvorming met de teststof) en geen ongunstige invloed heeft op de conditie van de broedvissen, moeten regelmatig monsters worden genomen en geanalyseerd. Als van het verdunningswater bekend is dat het een relatief constante kwaliteit heeft, worden ieder halfjaar zware metalen (bijvoorbeeld Cu, Pb, Zn, Hg, Cd en Ni), de belangrijkste anionen en kationen (bijvoorbeeld Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), bestrijdingsmiddelen, het totaalgehalte aan organische koolstof en zwevende deeltjes bepaald. In aanhangsel 2 worden enkele chemische kenmerken van aanvaardbaar verdunningswater vermeld. De pH-waarde moet binnen een bereik van 6,5 tot 8,5 blijven, maar tijdens een test mag deze niet meer dan $\pm 0,5$ pH-eenheden schommelen.

Blootstellingssysteem

13. De voor het blootstellingssysteem gebruikte opzet en materialen worden niet gespecificeerd. Voor het opbouwen van het testsysteem wordt gebruik gemaakt van glas, roestvrijstaal of ander chemisch inert materiaal, dat niet is verontreinigd tijdens eerdere tests. Voor deze test kan een goed geschikt blootstellingssysteem bestaan in een systeem met continue doorstroom (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Testoplossingen

14. Met behulp van een geschikte pomp wordt de stamoplossing van de teststof aan het blootstellingssysteem toegevoerd. De doorstroomsnelheid van de stamoplossing moet voor aanvang van de blootstelling worden gekalibreerd volgens de analytische bevestiging van de testoplossingen en gedurende de test op gezette tijden volumetrisch worden gecontroleerd. De testoplossing in elke kamer wordt voldoende ververs (bv. volume wordt ten minste 5 tot 16 keer per dag of met een stroomsnelheid tot 20 ml/min ververs), afhankelijk van de stabiliteit van de teststof en de waterkwaliteit.
15. De testoplossingen met de gekozen concentraties worden bereid door verdunning van een stamoplossing. De stamoplossing wordt bij voorkeur bereid door eenvoudig mengen en schudden van de teststof in het verdunningswater met mechanische middelen (bijvoorbeeld door te roeren en/of met ultrasone trillingen). Voor het maken van een stamoplossing van een passende concentratie kunnen verzadigingskolommen/-systemen of passieve doseringsmethoden (14) worden gebruikt. Alles moet in het werk worden gesteld om oplosmiddelen en draagvloeistoffen te vermijden, omdat: 1) bepaalde oplosmiddelen zelf toxiciteit en/of ongewenste of onverwachte endocrinologische reacties kunnen

veroorzaken, 2) het testen van chemicaliën boven hun oplosbaarheid in water (zoals vaak kan gebeuren door het gebruik van oplosmiddelen) kan leiden tot een onnauwkeurige bepaling van de effectieve concentraties, 3) het gebruik van oplosmiddelen in tests op langere termijn kan leiden tot de vorming van een aanzienlijke "biofilm" als gevolg van microbiële activiteit die van invloed kan zijn op de omgevingsomstandigheden en op het vermogen om de blootstellingsconcentraties te handhaven, en 4) bij gebrek aan historische gegevens die aantonen dat het oplosmiddel de uitkomst van de studie niet beïnvloedt, het gebruik van oplosmiddelen een oplosmiddelcontrole noodzakelijk maakt, wat gevolgen heeft op het vlak van dierenwelzijn, aangezien er extra dieren nodig zijn voor het uitvoeren van de test. Voor moeilijk te testen chemische stoffen kan in laatste instantie een oplosmiddel worden gebruikt; raadpleeg OESO-leidraad nr. 23 voor het testen op aquatische toxiciteit bij moeilijke stoffen en mengsels (15) om de beste methode te bepalen. De keuze van het juiste oplosmiddel hangt af van de chemische eigenschappen van de teststof en de beschikbaarheid van historische gegevens over het gebruik van het oplosmiddel. Bij gebruik van oplosmiddelen als draagvloeistof moeten passende oplosmiddelcontroles worden geëvalueerd in aanvulling op (negatieve) controles zonder oplosmiddel (alleen verdunningswater). Als het gebruik van een oplosmiddel onvermijdelijk is en er microbiële activiteit (biofilm) optreedt, wordt aanbevolen gedurende de hele test de biofilmvorming in elke bak (ten minste wekelijks) te registreren/rapporteren. Idealiter moet de oplosmiddelconcentratie in de oplosmiddelcontrole en alle testbehandelingen constant worden gehouden. Als de concentratie oplosmiddel niet constant wordt gehouden, moet in de oplosmiddelcontrole de hoogste concentratie oplosmiddel van de testbehandeling worden gebruikt. Bij gebruik van een oplosmiddel als draagvloeistof mogen de oplosmiddelconcentraties niet hoger zijn dan 100 µl/l of 100 mg/l (15), en wordt aanbevolen de oplosmiddelconcentratie zo laag mogelijk te houden (bv. < 20 µl/l) om potentiële effecten van het oplosmiddel op de gemeten eindpunten te vermijden (16).

Proefdieren

Keuze en leefomstandigheden van de vis

16. De testsoort is het Japanse rijstvisje, *Oryzias latipes*, vanwege de korte levenscyclus en de mogelijkheid het genetisch geslacht te bepalen. Hoewel andere kleine vissoorten mogelijk ook geschikt zijn voor een vergelijkbaar testprotocol, gelden de in deze testmethode beschreven specifieke methoden en gemeten eindpunten alleen voor het Japanse rijstvisje (zie punt 1). Het Japanse rijstvisje kan in gevangenschap eenvoudig tot voortplanting worden aangezet; er bestaan gepubliceerde methoden voor de kweek ervan (17) (18) (19), en er zijn testgegevens beschikbaar over kortetermijnsterfte, vroege levensstadium en volledige levenscyclus (5) (6) (8) (9) (20). Voor alle vissen is de fotoperiode 16 uur licht, 8 uur donker. Het voer bestaat uit levende pekelkreeftjes, *Artemia* spp., nauplii, indien nodig

aangevuld met in de handel verkrijgbare voervlokken. In de handel verkrijgbare voervlokken moeten regelmatig worden onderzocht op verontreiniging.

17. Zolang passende praktijken worden gevolgd voor het houden van de dieren, is er geen specifiek kweekprotocol vereist. Rijstvisjes kunnen bijvoorbeeld in 2-literbakken met 240 vissenlarven per bak worden gekweekt tot 4 wpf, daarna in 2-literbakken met 10 vissen per bak tot 8 wpf, wanneer zij verdergaan als broedpaartjes in 2-literbakken.

Acclimatisering en selectie van vissen

18. De testvissen moeten worden geselecteerd uit één laboratoriumstam die voor aanvang van de test ten minste twee weken is gehouden onder omstandigheden die qua waterkwaliteit en verlichting overeenkomen met die tijdens de test (opmerking: deze acclimatiseringsperiode is geen pre-blootstellingsperiode in situ). Het verdient aanbeveling de testvissen te verkrijgen uit eigen kweek, aangezien het vervoer van volwassen vissen leidt tot stress en kan afdoen aan de betrouwbaarheid van het kuitschieten. De vissen worden de gehele periode van hun verblijf en tijdens de blootstellingsfase twee keer per dag gevoerd met larvale pekelkreeftjes, indien nodig aangevuld met in de handel verkrijgbare voervlokken. Om replicatie afdoende te waarborgen, moet deze test worden begonnen met ten minste 42 broedpaartjes (54 broedpaartjes indien controle met oplosmiddel is vereist, mede vanwege een gebrek aan historische gegevens die het gebruik van alleen de controlegroep met oplosmiddel ondersteunen). Verder moet worden geverifieerd dat elk broedpaartje van F0 XX-XY is (d.w.z. normale complement van de geslachtschromosomen in elk geslacht) om te vermijden dat spontane XX-mannetjes in de test kunnen worden opgenomen (zie punt 39).
19. Tijdens de acclimatiseringsperiode wordt het sterftecijfer van de kweekvis geregistreerd en worden na een gewenningsperiode van 48 uur de volgende criteria toegepast:
 - sterftecijfer is hoger dan 10 % van de kweekpopulatie in de zeven dagen voordat de vissen worden overgebracht naar het testsysteem: de hele partij wordt afgekeurd;
 - sterftecijfer is tussen 5 % en 10 % van de populatie in de zeven dagen voordat de vissen worden overgebracht naar het testsysteem: acclimatisering gedurende nog zeven dagen na de acclimatiseringsperiode van twee weken; als het sterftecijfer gedurende deze zeven dagen hoger dan 5 % is, wordt de gehele partij afgekeurd;
 - sterftecijfer is minder dan 5 % van de populatie in de zeven dagen voordat de vissen worden overgebracht naar het testsysteem: de partij wordt geaccepteerd.
20. De vissen mogen geen behandeling krijgen wegens ziekte in de acclimatiseringsperiode van twee weken voor de test en tijdens de blootstellingsperiode, en iedere ziektebehandeling zou zo mogelijk moeten worden vermeden. Vissen met klinische

ziekteverschijnselen mogen in dit onderzoek niet worden gebruikt. Er moet een verslag worden bijgehouden van de waarnemingen en eventuele profylactische en therapeutische behandelingen van ziekten tijdens de kweekperiode voorafgaand aan de test.

21. De blootstellingsfase begint met seksueel dimorfe, genetisch gesekste volwassen vissen uit een laboratoriumaanbod van geslachtsrijpe, bij 25 ± 2 °C gekweekte dieren. Van de vissen is in de week voor blootstelling de vruchtbaarheid aangetoond (d.w.z. ze hebben levensvatbare nakomelingen voortgebracht). Voor de gehele groep vissen die in deze test wordt gebruikt, geldt dat het bereik van het afzonderlijke gewicht per geslacht aan het begin van de test binnen ± 20 % van het rekenkundig gemiddelde gewicht van het desbetreffende geslacht wordt gehouden. Voorafgaand aan de test wordt een submonster van de vissen gewogen om het gemiddelde gewicht te schatten. De geselecteerde vissen zijn ten minste 12 wpf en het gewicht per vis is ≥ 300 mg voor vrouwtjes en ≥ 250 mg voor mannetjes.

TESTOPZET

Testconcentraties

22. Het wordt aanbevolen gebruik te maken van vijf concentraties van de teststof plus een of meer controlegroepen. Bij het kiezen van het bereik van de testconcentraties moeten alle informatiebronnen worden overwogen, met inbegrip van kwantitatieve structuur-activiteitsrelaties (QSAR's), read-across van analogen, resultaten van vistests zoals bepalingen van acute sterfte (hoofdstuk C.1 van deze bijlage), de bepaling voor kortetermijneffecten op de voortplanting van vissen (hoofdstuk C.48 van deze bijlage) en andere testmethoden, bv. hoofdstukken C.15, C.37, C.41, C.47 of C.49 van deze bijlage (21) (22) (23) (24) (25) (26), indien beschikbaar, of, indien nodig, van een bereikbepalingstest die mogelijk een voortplantingsfase omvat. Indien nodig kan de bereikbepalingstest worden uitgevoerd onder omstandigheden (waterkwaliteit, testsysteem, dierbelasting) die vergelijkbaar zijn met die van de definitieve test. Als het gebruik van een oplosmiddel noodzakelijk is en er zijn geen historische gegevens beschikbaar, kan de bereikbepalingstest worden gebruikt om vast te stellen of het oplosmiddel geschikt is. De hoogste testconcentratie mag de limiet voor oplosbaarheid in water niet overschrijden: 10 mg/l of 1/10e van de 96-urige LC50 (27). De laagste concentratie is 10 tot 100 keer kleiner dan de hoogste concentratie. Het gebruik van vijf concentraties in deze test maakt het niet alleen mogelijk dosis-responsverhoudingen te meten maar ook de laagste concentratie met waargenomen effecten (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC) en de concentratie waarbij geen effect wordt waargenomen (No Observed Effect Concentration, NOEC) te bepalen. Deze zijn in sommige regelgevingsprogramma's en rechtsgebieden nodig voor de risicobeoordeling. Doorgaans is de intervalfactor tussen de nominale concentraties van de teststof voor opeenvolgende behandelingsniveaus $\leq 3,2$.

Duplo's binnen behandelingsgroepen en controles

23. Er worden per testconcentratie ten minste zes duplotestkamers gebruikt (zie aanhangsel 7). Tijdens de voortplantingsfase (behalve de F0-generatie) wordt de duplostructuur verdubbeld voor de beoordeling van de fecunditeit en heeft elke duplo slechts één broedpaartje (zie punt 42).
24. Naast de testconcentraties wordt gebruikgemaakt van een controle met verdunningswater en, indien nodig, een controle met oplosmiddel. Het gebruik van een dubbel aantal duplokamers voor de controlegroepen dient om te zorgen voor voldoende statistisch onderscheidingsvermogen (d.w.z. ten minste twaalf duplo's voor controle). Tijdens de voortplantingsfase wordt het aantal duplo's in de controlegroepen verdubbeld (d.w.z. 24 duplo's als minimum en niet meer dan één broedpaartje per duplo). Na de voortplanting mag het aantal embryo's (vissen) in de controleduplo's niet meer dan 20 zijn.

PROCEDURE

Start van de test

25. De seksueel actieve volwassen vissen waarmee de F0-generatie van de test wordt gestart, worden geselecteerd volgens twee criteria: leeftijd (meestal meer dan 12 wpf maar met een aanbevolen maximum van 16 wpf) en gewicht (≥ 300 mg voor vrouwtjes en ≥ 250 mg voor mannetjes).
26. Bij aanvang van de test worden paartjes van een mannetje en een vrouwtje die aan bovenstaande specificaties beantwoorden, als afzonderlijke paartjes verplaatst naar elke duplobak, d.w.z. twaalf duplo's in controles en zes duplo's in chemische behandelingen. Aan deze bakken worden willekeurig een behandeling (bv. T1-T5 en controle) en een duplo (bv. A-L in controles en A-F in behandeling) toegewezen en vervolgens worden ze in het blootstellingssysteem geplaatst, met de juiste stroom naar elke bak.

Blootstellingsomstandigheden

27. In aanhangsel 3 staat een volledig overzicht van de testparameters en -omstandigheden. Bij uitvoering volgens deze specificaties zouden de controlevissen eindpuntwaarden moeten hebben die vergelijkbaar zijn met die in aanhangsel 4.
28. Tijdens de test worden opgeloste zuurstof, pH-waarde en temperatuur gemeten in ten minste één testbak van elke behandelde groep en de controlegroep. Met uitzondering van de temperatuurmeting worden deze metingen tijdens de blootstellingsperiode ten minste één keer per week uitgevoerd. De watertemperatuur moet gemiddeld over de gehele duur van het onderzoek en de test tussen de 24 °C and 26 °C liggen. De temperatuur wordt tijdens de gehele blootstellingsperiode elke dag gemeten. De pH-waarde moet binnen een

bereik van 6,5 tot 8,5 blijven, maar tijdens een test mag deze niet meer dan $\pm 0,5$ pH-eenheden schommelen. Duplo's binnen een behandelde groep mogen statistisch niet van elkaar verschillen en behandelde groepen binnen de test mogen statistisch niet van elkaar verschillen (op basis van dagelijkse temperatuurmeting en met uitzondering van kortstondige afwijkingen).

Duur van de blootstelling

29. Tijdens de test worden seksueel actieve vissen van F0 drie weken lang blootgesteld. In week 4 wordt ongeveer op testdag 24 F1 tot stand gebracht en worden de F0-broedpaartjes op humane wijze gedood en worden gewicht en lengte geregistreerd (zie punt 34). Daarna volgt blootstelling van de F1-generatie gedurende nog 14 weken (in totaal 15 weken voor F1) en van de F2-generatie gedurende twee weken tot de eitjes uitkomen. De totale duur van de test is primair 19 weken (d.w.z. tot het uitkomen van de eitjes van F2). De tijdlijnen voor de test staan in tabel 2 en worden nader toegelicht in aanhangsel 9.

Voerschema

30. De vissen kunnen ad libitum worden gevoerd met pekelkreeftjes *Artemia* spp. (24 uur oude nauplii), indien nodig aangevuld met in de handel verkrijgbare voervlokken. In de handel verkrijgbare voervlokken moeten regelmatig worden onderzocht op verontreinigende stoffen zoals organochloorpesticiden, polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's) en polychloorbifenylen (PCB's). Voer met een hoog gehalte aan endocrien werkzame stoffen (d.w.z. fyto-oestrogenen) die de testreactie zouden kunnen verstoren, moet worden vermeden. Uitwerpselen en niet opgegeten voer worden moeten naar behoefte uit de testbakken worden verwijderd, bv. door de bodem van elke bak zorgvuldig te reinigen met een hevel. Bovendien moeten de zijkanten en bodem van elke bak één of twee keer per week worden schoongemaakt (bv. afschrappen met een spatel). In aanhangsel 5 staat een voorbeeld van een schema voor het voeren van de vissen. De frequentie van het voeren is gebaseerd op het aantal vissen per duplo. Bij sterfte in een duplo worden de vissen dus minder vaak gevoerd.

Analytische bepaling en metingen

31. Voor aanvang van de blootstellingsperiode moet de juiste werking van het afgiftesysteem van de teststof zijn gewaarborgd. Alle noodzakelijke analysemethoden moeten worden vastgesteld, inclusief voldoende kennis over de chemische stabiliteit in het testsysteem. Gedurende de test worden de concentraties van de teststof op geschikte tijdstippen bepaald, bij voorkeur ten minste iedere week in één duplo per behandelde groep, waarbij elke week geroteerd wordt tussen de duplo's van dezelfde behandelingsgroep.
32. Tijdens de test worden de stroomsnelheden van het verdunningsmiddel en de stamplossing dienovereenkomstig regelmatig gecontroleerd (bv. ten minste drie keer per

week). Het is wenselijk de resultaten te baseren op gemeten concentraties. Indien de concentratie van de teststof in de oplossing gedurende de gehele test goed binnen een marge van $\pm 20\%$ van de gemiddelde gemeten waarden is gehouden, mogen de resultaten worden gebaseerd op hetzij nominale hetzij gemeten waarden. In het geval van chemische stoffen die zich duidelijk opstapelen in vissen, kunnen de testconcentraties afnemen naarmate de vissen groeien. In zulke gevallen wordt aanbevolen de testoplossing in elke kamer zo vaak te verversen als nodig is om de testconcentraties zo constant mogelijk te houden.

Waarnemingen en gemeten eindpunten

33. Gemeten eindpunten zijn fecunditeit, fertiliteit, uitkomen, groei en overleving om mogelijke effecten op populatieniveau te beoordelen. Het gedrag wordt dagelijks geobserveerd en eventueel ongebruikelijk gedrag wordt geregistreerd. Andere mechanistische eindpunten zijn de gehalten aan *vtg*-mRNA- of VTG-eiwit in de lever door middel van een immunologische bepaling (28), fenotypische geslachtsmarkers zoals kenmerkende anaalvinpapillen van mannetjes, histologische beoordeling van gonadaal geslacht en histopathologische beoordeling van nier, lever en geslachtsklier (zie overzicht eindpunten in tabel 1). Al deze specifieke eindpunten worden beoordeeld in het kader van de bepaling van het genetische geslacht van de vis, op basis van de aanwezigheid of afwezigheid van het gen dat het mannelijk geslacht van het Japanse rijstvisje bepaalt: *dmy* (zie punt 41). Verder wordt de tijd tot het kuitschieten beoordeeld. Daarnaast kunnen eenvoudige fenotypische geslachtsverhoudingen worden bepaald aan de hand van de informatie uit tellingen van anaalvinpapillen om van elk visje vast te stellen of het fenotypisch een mannetje of vrouwtje is. Met deze testmethode zullen kleine afwijkingen van de verwachte geslachtsverhouding waarschijnlijk niet worden opgemerkt, omdat de betrekkelijk kleine aantallen vissen per duplo niet zorgen voor voldoende statistisch onderscheidingsvermogen. In de loop van de histopathologische beoordeling wordt verder ook de geslachtsklier geëvalueerd en worden veel krachtiger analyses uitgevoerd om het fenotype van de geslachtsklier te beoordelen in de context van het genetische geslacht.
34. Deze testmethode is primair bedoeld om te beoordelen welke voor een populatie relevante effecten een teststof kan hebben. Verder kan met behulp van mechanistische eindpunten (VTG, SSC en bepaalde gonadale histopathologische effecten) worden bepaald of een effect wordt gemedieerd via endocriene activiteit. Deze mechanistische eindpunten kunnen echter ook worden beïnvloed door systemische en andere vormen van toxiciteit. Bijgevolg kan ook de histopathologie van lever en nier nader worden beoordeeld om meer inzicht te krijgen in eventuele reacties in mechanistische eindpunten. Als deze gedetailleerde beoordelingen niet worden uitgevoerd, is het belangrijk dat de bij de histopathologische beoordeling incidenteel waargenomen macroscopische afwijkingen toch worden geregistreerd en in het verslag worden opgenomen.

Op humane wijze doden van de vissen

35. Bij het nemen van submonsters van subvolwassen vissen aan het eind van de blootstelling van de F0- en de F1-generatie worden de vissen gedood met passende hoeveelheden van een anesthesieoplossing (bv. triclaïnemethaansulfonaat, MS-222 (CAS.886-86-2), 100-500 mg/l), gebufferd met 300 mg/l NaHCO₃ (natriumbicarbonaat, CAS.144-55-8), ter vermindering van slijmvliesirritatie. Als vissen tekenen van aanzienlijk lijden vertonen (zeer ernstige gevallen waarbij de dood betrouwbaar kan worden voorspeld) en als stervende beschouwd kunnen worden, moeten ze worden verdoofd en gedood en voor de gegevensanalyse worden meegerekend onder sterfte. Wanneer een vis wordt geëuthanaseerd vanwege ziekelijkheid moet dit worden genoteerd en in het studieverslag worden opgenomen. Afhankelijk van het moment in de studie waarop de vis gedood werd, kan deze worden bewaard zodat een histopathologische analyse kan worden uitgevoerd (waarbij de vis wordt gefixeerd voor eventuele histopathologie).

Behandeling van eitjes en vissenlarven

Verzameling van eitjes van broedpaartjes voor vermeerdering van de volgende generatie

36. Eitjes worden verzameld op de eerste dag (of de eerste twee dagen, indien nodig) van testweek 4 om van F0 naar F1 te gaan, en van testweek 18 om van F1 naar F2 te gaan. Testweek 18 komt overeen met volwassen F1-vissen, 15 wpf (weken na bevruchting). Het is belangrijk dat alle eitjes uit elke bak worden verwijderd op de dag voordat wordt begonnen met het verzamelen, om er zeker van te zijn dat alle van een broedpaartje verzamelde eitjes van één legsel zijn. Na het kuitschieten draagt het vrouwelijke Japanse rijstvisje de eitjes soms in de buurt van de anus tot de eitjes op een substraat kunnen worden afgezet. Als er geen substraat is in de bak, zijn de eitjes te vinden op het vrouwtje of op de bodem van de bak. Afhankelijk van waar zij zich bevinden, worden de eitjes voorzichtig van het vrouwtje afgenomen of van de bodem overgeheveld, in testweek 4 voor F0 en in testweek 18 voor F1. Alle binnen een behandelde groep verzamelde eitjes worden bijeengevoegd, voordat zij over incubatiekamers worden verdeeld.
37. De eidraden die de eitjes van het legsel bijeenhouden, moeten worden verwijderd. Bevruchte eitjes (tot 20) worden verzameld van elk broedpaartje (één paar per duplo), bijeengevoegd voor behandeling en stelselmatig verdeeld over geschikte incubatiekamers (aanhangsels 6 en 7). Met een goede stereomicroscoop kunnen kenmerken van vroege bevruchting/ontwikkeling worden gezien, zoals het ontstaan van het vruchtvlies (chorion), doorlopende celdeling of vorming van de blastula. De incubatiekamers kunnen worden geplaatst in aparte, voor elke behandelde groep opgezette "incubatoraquaria" (in welk geval daarin de waterkwaliteitsparameters en concentraties van de teststof worden gemeten) of in het duplo-aquarium met daarin uitgekomen larven (bv. eleuthero-embryo). Indien er op een tweede dag moet worden verzameld (testdag 23), worden alle eitjes van beide dagen

bijgevoegd en vervolgens stelselmatig opnieuw verdeeld over elk van de behandelde duplo's.

Ontwikkeling van eitjes tot uitkomen

38. Bevruchte eitjes worden voortdurend in beweging gehouden, bv. binnen de ei-incubator door luchtbelletjes of door de ei-incubator verticaal rond te draaien. Elke dag wordt de sterfte onder bevruchte eitjes (embryo's) gecontroleerd en geregistreerd. Dode eitjes worden uit de incubators verwijderd (aanhangel 9). Op de zevende dag na bevruchting (dnb) wordt de beweging gestopt of verminderd, zodat de bevruchte eitjes op de bodem van de incubator komen te liggen. Dat is bevorderlijk voor het uitkomen, wat meestal na één of twee dagen plaatsvindt. Per behandelde groep en controlegroep worden de uitgekomen eitjes (jonge larven; eleuthero-embryo) geteld (op basis van bijgevoegde duplo's). Bevruchte eitjes die na tweemaal de mediane dag waarop eitjes uitkomen in de controlegroep (meestal 16 of 18 dnb) niet zijn uitgekomen, worden als niet-levensvatbaar beschouwd en afgevoerd.
39. Naar elke duplobak worden twaalf larven overgebracht. De larven uit de incubatiekamers worden bijgevoegd en stelselmatig verdeeld over de duplobakken (aanhangel 7). Dat kan worden gedaan door willekeurig een larve uit de behandelde groep te nemen en achtereenvolgens larven volgens een aselechte procedure aan een duplo-aquarium toe te voegen. Elke bak moet een gelijk aantal ($n=12$) uitgekomen larven bevatten (maximaal 20 larven per bak). Als er niet genoeg larven zijn om alle behandelde duplo's te vullen, wordt aanbevolen ervoor te zorgen dat zoveel mogelijk duplo's 12 larven tellen. Uitgekomen eitjes kunnen veilig worden verwerkt met een glazen pipet met een grote binnendiameter. Alle eventuele overige larven worden met een verdovingsmiddel op humane wijze gedood. In de weken voorafgaand aan het voorbereiden van broedpaartjes moet worden geregistreerd op welke dag er in elke duplo voor het eerst wordt kuitgeschoten.

Voorbereiding van broedpaartjes

Bepaling van genotypisch geslacht met vinweefsel

40. Het bepalen van het genotypisch geslacht aan de hand van vinweefsel vindt plaats 9-10 wpf (d.w.z. in testweek 12-13 voor F1-generatie). Alle vissen in een bak worden verdoofd (met goedgekeurde methoden, bv. IACUC) en er wordt aan rug- of buikzijde een klein weefselmonster genomen van het uiteinde van de staartvin van elke vis om het genotypisch geslacht te bepalen (29). De vissen van een duplo kunnen worden ondergebracht in kleine kooien, indien mogelijk één per kooi, in de duplobak. Het is ook mogelijk om in elke kooi twee vissen te houden, als zij van elkaar te onderscheiden zijn.

Een van de methoden is om bij het nemen van het weefsel de staartvin differentieel te snijden (bv. uiteinde rug- vs. buikzijde).

41. Het genotypisch geslacht van het Japanse rijstvisje wordt bepaald door een geïdentificeerd en gesequencet gen (*dmy*) dat zich op het Y-chromosoom bevindt. De aanwezigheid van *dmy* wijst ongeacht het fenotype op een XY-vis, terwijl de afwezigheid van *dmy* ongeacht het fenotype wijst op een XX-vis (30) (31). Uit elk stukje vinweefsel wordt desoxyribonucleïnezuur (DNA) genomen; de aanwezigheid of afwezigheid van *dmy* kan worden bepaald met PCR-methoden (polymerase-kettingreactie) (zie aanhangsel 9 in hoofdstuk C.41 van deze bijlage, of aanhangsels 3 en 4 in (29)).

Vorming van broedpaartjes

42. Aan de hand van de informatie over genotypisch geslacht worden XX-XY broedpaartjes gevormd, ongeacht extern fenotype, die bij blootstelling aan een teststof kunnen veranderen. Op de dag nadat het genotypisch geslacht van elke vis is bepaald, worden uit elke duplo willekeurig twee XX-vissen en twee XY-vissen genomen en worden twee XX-XY-broedpaartjes gevormd. Als er in een duplo niet hetzij twee XX-vissen hetzij twee XY-vissen voorkomen, moeten er geschikte vissen uit andere duplo's binnen de behandeling worden verkregen. Prioriteit heeft de beschikbaarheid van het aanbevolen aantal duplobroedpaartjes (12) in elke behandelde groep en in de controlegroepen (24). Vissen met duidelijke afwijkingen (zwemblaasproblemen, vervorming van de wervelkolom, extreme verschillen in grootte enz.) worden uitgesloten bij het vormen van broedpaartjes. Tijdens de voortplantingsfase voor F1 mag elke bak maar één broedpaartje bevatten.

Bemonstering van subvolwassen vissen en eindpuntbeoordeling

Bemonstering van vissen die geen broedpaartjes vormen

43. Na vorming van broedpaartjes worden de vissen die niet zijn geselecteerd voor verdere kweek, in testweek 12-13 (F1) op humane wijze gedood om eindpunten van subvolwassen vissen te meten. Het is van het grootste belang de vissen zodanig te behandelen dat het genotypisch geslacht dat is bepaald voor de selectie van broedpaartjes, nog kan worden teruggevoerd naar een afzonderlijke vis. Alle verzamelde gegevens worden geanalyseerd in de context van het genotypisch geslacht van de desbetreffende vis. Elke vis wordt gebruikt voor diverse eindpuntmetingen, zoals: bepaling van overlevingspercentages van juveniele/subvolwassen vissen (testweken 7-12/13 (F1)), lengtegroei (meet de standaardlengte als de staartvin is ingekort omdat een monster is genomen voor analyse van het genetisch geslacht. Meet de totale lengte als slechts een deel van de staartvin, rug- of buikzijde, is bemonsterd voor *dmy*) en lichaamsmassa (d.w.z. nat gewicht, drooggedept), lever *vgt*-mRNA (of VTG) en anaalvinpapillen (zie tabellen 1 en 2). Merk

op dat gewicht en lengte van de broedpaartjes ook nodig zijn om de gemiddelde groei in een behandelde groep te berekenen.

Weefselbemonstering en vitellogeninemeting

44. De lever wordt ontleed en bewaard bij ≤ -70 °C tot de metingen van *vtg*-mRNA (of VTG). De staart van de vis, inclusief de anaalvin, wordt geconserveerd in een geschikt fixeermiddel (bv. van Davidson) of gefotografeerd, zodat het later mogelijk is de anaalvinpapillen te tellen. Indien gewenst, kunnen op dat moment andere weefsels (bv. van geslachtsklier) worden bemonsterd en geconserveerd). De VTG-concentratie in de lever wordt gekwantificeerd met behulp van een homologe ELISA-techniek (zie de aanbevolen procedures voor Japanse rijstvisjes in aanhangsel 6 in hoofdstuk C.48 van deze bijlage). Anderzijds zijn de methoden voor kwantificatie van *vtg*-mRNA, d.w.z., extractie van *vtg I*-gen-mRNA uit een levermonster en kwantificatie van het aantal kopieën van het *vtg I*-gen (per ng totaal mRNA) met behulp van kwantitatieve PCR, vastgesteld door VS-EPA (29). In plaats van het aantal kopieën van het *vtg*-gen in de controlegroep en de behandelde groep te bepalen, is het efficiënter en technisch minder lastig om de relatieve (x-voudige) verandering in *vtg I*-expressie van de controlegroep en de behandelde groep te bepalen.

Secundaire geslachtskenmerken

45. Onder normale omstandigheden hebben alleen geslachtsrijpe mannelijke Japanse rijstvisjes papillen, die als secundaire geslachtskenmerken ontstaan op de verbindingsplaten van bepaalde anaalvinstralen en aldus als biomarker kunnen dienen voor hormoonontregelende effecten. De methode voor het tellen van anaalvinpapillen (het aantal verbindingsplaten met papillen) staat in aanhangsel 8. Verder dient het aantal anaalvinpapillen om elke vis in te delen als uitwendig fenotypisch mannelijk of vrouwelijk en per duplo een eenvoudige geslachtsverhouding te berekenen. Een Japans rijstvisje met één of meer papillen wordt gedefinieerd als een mannetje; een Japans rijstvisje met 0 papillen wordt gedefinieerd als vrouwtje.

Beoordeling fecunditeit en fertiliteit

46. Fecunditeit en fertiliteit worden beoordeeld in testweek 1 tot en met 3 in de F0-generatie en in testweek 15 tot en met 17 in de F1-generatie. Op 21 achtereenvolgende dagen worden van elk broedpaartje dagelijks eitjes verzameld. De eitjes worden iedere morgen voorzichtig verwijderd van in een net gevangen vrouwtjes en/of overgeheveld van de bodem van het aquarium. Dagelijks worden van elk duplobroedpaartje de fecunditeit en fertiliteit geregistreerd. Fecunditeit wordt gedefinieerd als het aantal geproduceerde eitjes. Fertiliteit is functioneel gedefinieerd als het aantal bevruchte en levensvatbare eitjes op het moment van de telling. De telling vindt zo snel mogelijk na het verzamelen van de eitjes plaats.

47. De duplofecunditeit wordt dagelijks geregistreerd als het aantal eitjes per broedpaartje, dat wordt geanalyseerd met behulp van de aanbevolen statistische procedures, waarbij de duplogemiddelden worden gebruikt. De duplofertiliteit is de som van het aantal door een broedpaartje geproduceerde vruchtbare eitjes gedeeld door de som van het aantal door dat paar geproduceerde eitjes. Statistisch wordt fertiliteit geanalyseerd als een verhouding per duplo. Het duplo-uitkomstpercentage is het aantal larven gedeeld door het aantal geladen embryo's (meestal 20). Statistisch wordt uitkomstpercentage geanalyseerd als een verhouding per duplo.

Bemonstering van volwassen vissen en eindpuntbeoordeling

Bemonstering van vissen die broedpaartjes vormen

48. Na testweek 17 (d.w.z. na het geslaagde begin van de F2-generatie) worden de volwassen F1-vissen op humane wijze gedood en worden diverse eindpunten beoordeeld (zie de tabellen 1 and 2). Van de anaalvin wordt een beeld verkregen voor een beoordeling van anaalvinpapillen (zie aanhangsel 8) en/of de staart, direct achter de anus, wordt verwijderd en gefixeerd om later de papillen te tellen. Indien gewenst, kan op dit moment een deel van de staartvin worden bemonsterd en bewaard voor verificatie van het genetisch geslacht (*dmy*). Indien nodig, kan een weefselmonster worden genomen om de *dmy*-analyse te herhalen voor verificatie van het genetisch geslacht van een bepaalde vis. De lichaamsholte wordt geopend voor perfusie met een geschikt fixeermiddel (bv. van Davidson) voordat het lichaam in zijn geheel in het fixeermiddel wordt ondergedompeld. Als in een aan de fixatie voorafgaande stap echter voor passende doorlaatbaarheid wordt gezorgd, is het niet nodig de lichaamsholte te openen.

Histopathologie

49. Elke vis wordt histologisch beoordeeld op pathologie in het weefsel van de geslachtsklieren (30); (29). Zoals vermeld in punt 33, kunnen andere in deze bepaling geëvalueerde mechanistische eindpunten (d.w.z. VTG, SSC en bepaalde gonadale histopathologische effecten) worden beïnvloed door systemische of andere vormen van verontreiniging. Bijgevolg kan ook de histopathologie van lever en nier nader worden beoordeeld om meer inzicht te krijgen in eventuele reacties in mechanistische eindpunten. Als deze gedetailleerde beoordelingen niet worden uitgevoerd, is het belangrijk dat de bij de histopathologische beoordeling incidenteel waargenomen macroscopische afwijkingen toch worden geregistreerd en in het verslag worden opgenomen. Een mogelijke benadering is een "read-down" van de behandelde groep met het grootste effect (vergeleken met de controlegroep) tot een behandeling zonder effect, maar het verdient aanbeveling de richtsnoeren voor histopathologie te raadplegen (29). Meestal worden alle monsters verwerkt/ontleed en vervolgens gelezen door de patholoog. In het geval van een "read-down" benadering wordt opgemerkt dat er in de RSCABS-procedure (Rao-Scott Cochrane-

Armitage by Slices) van wordt uitgegaan dat, naarmate de dosis wordt verhoogd, ook het biologische effect (de pathologie) toeneemt. Dat betekent dat het statistisch onderscheidingsvermogen afneemt als er slechts naar één hoge dosis wordt gekeken, zonder tussenliggende doses. Deze benadering kan aanvaardbaar zijn, als er geen statistische analyse nodig is om vast te stellen dat de hoge dosis geen effect heeft. Het fenotype van de geslachtsklier wordt ook aan de hand van deze beoordeling bepaald.

Andere opmerkingen

50. De MEOGRT verschaft gegevens die kunnen worden gebruikt (bv. in een op bewijskracht gebaseerde benadering) voor de gelijktijdige beoordeling van ten minste twee algemene typen Adverse Outcome Pathway (AOP) die leiden tot verstoorde voortplanting: a) met het endocrien systeem samenhangende wegen waarbij sprake is van hormoonontregeling van de HPG-as (hypothalamus-hypofyse-gonade); en b) paden die leiden tot minder overleving, groei (lengte en gewicht) en voortplanting vanwege niet met het endocrien systeem samenhangende toxiciteit. In deze test zijn ook eindpunten opgenomen die meestal worden gemeten in tests op chronische toxiciteit, zoals onderzoek van de volledige levenscyclus en onderzoek van het vroege levensstadium. Deze kunnen dienen ter beoordeling van de gevaren van zowel niet met het endocrien systeem samenhangende toxische werkingsmechanismen als wel met het endocrien systeem samenhangende toxiciteitswegen. Tijdens de test wordt het gedrag dagelijks geobserveerd en eventueel ongebruikelijk gedrag wordt geregistreerd. Daarnaast wordt sterfte bijgehouden en worden overleving tot het ruimen van vissen (testweek 6/7), overleving na het ruimen tot bemonstering van subvolwassen vissen (in 9-10 wpf) en overleving van paring tot bemonstering van volwassen vissen berekend.

Tabel 1: Overzicht eindpunten MEOGRT*

Levensfase	Eindpunt	Generatie
Embryo (2 wpf)	Uitkomen (% en tijd tot uitkomen)	F1, F2
Juveniel (4 wpf)	Overleving	F1
Subvolwassen (9 of 10 wpf)	Overleving	F1
	Groei (Lengte en gewicht)	
	Vitellogenine (mRNA of eiwit)	
	Secundaire geslachtskenmerken (anaalvinpapillen)	

	Externe verhouding mannetjes/vrouwtjes	
	Tijd tot 1e keer kuitschieten	
Volwassen (12-14 wpf)	Voortplanting (fecunditeit en fertiliteit)	F0, F1
Volwassen (15 wpf)	Overleving	F1
	Groei (Lengte en gewicht)	
	Secundaire geslachtskenmerken (anaalvinpapillen)	
	Histopathologie (Geslachtsklier, lever, nier)	

*Deze eindpunten moeten statistisch worden geanalyseerd

TIJDSHEMA

51. Tabel 2 is een illustratieve weergave van een tijdlijn voor de MEOGRT. De MEOGRT omvat 4 weken blootstelling voor volwassen F0-vissen en 15 weken blootstelling voor de F1-generatie, en een blootstellingsperiode voor de tweede generatie (F2), tot uitkomen (2 wpf). Aanhangel 9 bevat een overzicht van de activiteiten in de loop van de MEOGRT.

Tabel 2: Tijdslijn blootstelling en meting van eindpunten voor de MEOGRT.

Tijdslijn blootstelling en eindpunten MEOGRT																								
F0	1	2	3	4																				
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15						
F2																		1	2					
Testweek	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19					
Legenda levensfase					Embryo					Larve					Juveniel					Subvolwassen		Volwassen		
Eindpunten																								
Fecunditeit	F ₀														F ₁					• Proefopzet met 7 groepen duplo's ○ 5 voor behandelingen met teststof ○ 2 voor controlebehandelingen (4 bij gebruik van oplosmiddel) • Opzet binnen groep ○ 12 duplo's voor voortplanting, pathologie en SSC volwassen vissen (week 10 tot en met 18) ○ 6 duplo's voor uitkomen, overleving, Vtg; en SSC en groei subvolwassen (week 1 tot en met 9)				
Fertiliteit	F ₀														F ₁									
Uitkomen					F ₁													F ₂						
Overleving						F ₁						F ₁						F ₁						
Groei				F ₀								F ₁						F ₁						
Vitellogenine												F ₁												
Secundair geslacht												F ₁						F ₁						
Histopathologie																		F ₁						
Testweek	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	SSC: Secundaire geslachtskenmerken; Vtg: vitellogenine				

RAPPORTAGE VAN GEGEVENS

Statistische analyse

52. Aangezien van alle testvissen het genotypisch geslacht wordt bepaald, worden de gegevens voor elk genotypisch geslacht afzonderlijk geanalyseerd (d.w.z. XY-mannetjes en XX-vrouwtjes). Iedere analyse waarbij dit niet wordt gedaan, boet sterk in aan statistisch onderscheidingsvermogen. Statistische analyses van de gegevens moeten bij voorkeur worden uitgevoerd volgens de procedures beschreven in het OESO-document Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application (32). Aanhangsel 10 bevat verdere richtsnoeren voor de statistische analyse.
53. De testopzet en de selectie van statistische toetsen moeten voldoende onderscheidend vermogen waarborgen om biologisch significante veranderingen in de eindpunten op te sporen wanneer er een NOEC moet worden gerapporteerd (32). De rapportage van de relevante effectconcentraties en parameters kan afhankelijk zijn van het regelgevingskader. De procentuele verandering in elk eindpunt waarvan opsporing of raming significant is, wordt vastgesteld. De testopzet moet dat mogelijk maken. Het is niet waarschijnlijk dat

voor alle eindpunten dezelfde procentuele verandering geldt, en het is evenmin waarschijnlijk dat er een haalbaar experiment kan worden opgezet dat voor alle eindpunten aan deze criteria voldoet. Daarom is het van belang om bij het opzetten van het experiment bijzondere aandacht te schenken aan die eindpunten die van belang zijn voor het desbetreffende experiment. In aanhangsel 10 zijn een statistisch stroomschema en richtsnoeren opgenomen als hulp bij de behandeling van gegevens en bij de keuze van de geschiktste statistische toets of het geschiktste model. Andere statistische aanpakken mogen worden gebruikt voor zover zij wetenschappelijk gerechtvaardigd zijn.

54. De variatie moet binnen elke set replicaatbakken worden geanalyseerd met behulp van variantieanalyse of kruistabellen. Bij die analyse moet een voldoende passende statistische analysemethode worden gebruikt. Om een meervoudige vergelijking tussen de resultaten bij de afzonderlijke concentraties en die voor de controlegroepen te maken, wordt de stap-omlaagprocedure (bv. toets van Jonckheere-Terpstra) aanbevolen voor continue reacties. Als de gegevens niet overeenkomen met een monotone concentratierespons, wordt de toets van Dunnett-toets of de toets van Dunn gebruikt (na een passende gegevenstransformatie, indien nodig).
55. Voor fecunditeit worden dagelijks de eitjes geteld maar kunnen de tellingen worden geanalyseerd als totale aantallen of als herhaalde meting. Aanhangsel 10 geeft een nadere beschrijving van hoe dit eindpunt wordt geanalyseerd. Voor gegevens over histopathologie in de vorm van cijfers over de ernst is een nieuwe statistische toets ontwikkeld: de Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) (33).
56. Alle waargenomen eindpunten in met de teststof behandelde groepen die significant verschillen van passende controlegroepen, moeten in het studieverslag worden opgenomen.

Overwegingen met betrekking tot gegevensanalyse

Gebruik van aangetaste testniveaus

57. Er worden verschillende factoren meegewogen bij de vaststelling of een duplo of een gehele testgroep openlijke toxiciteit vertoont en uit de analyse moet worden weggenomen. Openlijke toxiciteit wordt gedefinieerd als > 4 sterftegevallen in een duplo tussen 3 wpf en 9 wpf die niet kunnen worden verklaard door technisch falen. Andere tekenen van openlijke toxiciteit zijn bloedingen, abnormaal gedrag, abnormale zwempatronen, anorexia en alle overige klinische ziektesymptomen. Voor niet-dodelijke tekenen van toxiciteit kunnen kwalitatieve beoordelingen nodig zijn, die altijd moeten worden uitgevoerd onder verwijzing naar de verdunningswatercontrolegroep (alleen schoon water). Bij openlijke toxiciteit in de hoogste behandeling(en) wordt aanbevolen die behandeling(en) te schrappen uit de analyse.

Controlegroepen met oplosmiddel

58. Het gebruik van een oplosmiddel mag alleen in laatste instantie worden overwogen, wanneer alle overige mogelijkheden om de teststof aan te bieden zijn uitgesloten. Als gebruik wordt gemaakt van een oplosmiddel, moet een bijbehorende verdunningswatercontrole worden uitgevoerd. Bij het einde van de test moet een beoordeling van de potentiële effecten van het oplosmiddel worden uitgevoerd. Hiertoe wordt een statistische vergelijking gemaakt tussen de oplosmiddelcontrolegroep en de verdunningswatercontrolegroep. De meest relevante eindpunten voor deze beoordeling zijn groeideterminanten (gewicht), omdat deze kunnen worden beïnvloed door gegeneraliseerde vormen van toxiciteit. Als er voor deze eindpunten statistisch significante verschillen worden gedetecteerd tussen de verdunningswatercontrolegroep en de oplosmiddelcontrolegroep, moet op basis van professioneel oordeel worden besloten of de validiteit van de test in het gedrang komt. Als de twee controles onderling afwijken, moeten de behandelingen die aan de teststof zijn blootgesteld, worden vergeleken met de oplosmiddelcontrole, tenzij bekend is dat vergelijking met de verdunningswatercontrole de voorkeur verdient. Als er geen statistisch significant verschil is tussen de twee controlegroepen, wordt aanbevolen de behandelingen die aan de teststof zijn blootgesteld, te vergelijken met de gepoolde controlegroepen (oplosmiddel en verdunningswater), tenzij bekend is dat vergelijking met hetzij de verdunningswatercontrolegroep, hetzij de oplosmiddelcontrolegroep de voorkeur verdient.

Testverslag

59. In het testverslag moet het volgende worden opgenomen:

Teststof: fysische aard en, indien relevant, fysisch-chemische eigenschappen;

- gegevens voor chemische identificatie.

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 van onzuiverheden, indien van toepassing en praktisch haalbaar enz. (met inbegrip van het gehalte aan organische koolstof, indien van toepassing).

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.

Testsoort:

- wetenschappelijke naam, stam, indien beschikbaar, bron en wijze van verzamelen van de bevruchte eitjes en daaropvolgende behandeling.

Testomstandigheden:

- fotoperiode(n);
- testopzet (bv. grootte en materiaal van de kamers, watervolume, aantal testkamers en duplo's, aantal larven per duplo);
- wijze waarop de stamoplossingen werden bereid en verversingsfrequentie (indien een ontsluitingsmiddel is gebruikt, moeten de aard en de concentratie daarvan worden vermeld);
- methode voor het doseren van de teststof (bv. pompen, verdunningssystemen);
- de recovery van de methode en de nominale testconcentraties, de bepaalbaarheidsgrens, de gemiddelden van de gemeten waarden en standaarddeviaties in de testbakken en de methode waarmee die werden verkregen, en bewijs dat de metingen betrekking hebben op de concentraties van de teststof in ware oplossing;
- kenmerken van het verdunningswater: pH, hardheid, temperatuur, gehalte aan opgeloste zuurstof, restchloorgehalte (indien gemeten), totale hoeveelheid organische koolstof (indien gemeten), zwevende deeltjes (indien gemeten), zoutgehalte van het testmedium (indien gemeten), alsmede de resultaten van eventuele andere metingen;
- de nominale testconcentraties, de gemiddelden van de meetwaarden en standaarddeviaties;
- de waterkwaliteit in testbakken: pH-graad, temperatuur (dagelijks) en opgeloste zuurstofconcentratie;
- gedetailleerde gegevens over de voeding (bijvoorbeeld het type voedsel, de leverancier, het rantsoen en de frequentie).

Resultaten:

- gegevens waaruit blijkt dat de controlegroepen voldeden aan de algemene validiteitscriteria;
- gegevens voor de controlegroepen (plus, indien gebruikt, controlegroepen met oplosmiddel) en de behandelde groepen als volgt: uitkomen eitjes (uitkomstpercentage en tijd tot uitkomen) voor F1 en F2, overleving na uitkomst voor F1, groei (lengte en lichaamsgewicht) voor F1, genotypisch geslacht en geslachtsdifferentiatie (bv. secundaire geslachtskenmerken op basis van anaalvinpapillen en histologie geslachtsklier) voor F1,

fenotypisch geslacht voor F1, secundaire geslachtskenmerken (papillen aarsvin) voor F1, *vtg* mRNA (of VTG-eiwit) voor F1, beoordeling histopathologie (geslachtsklier, lever en nier) voor F1 en voortplanting (fecunditeit en fertiliteit) voor F0, F1; (zie de tabellen 1 en 2).

- gebruikte aanpak voor de statistische analyse (regressieanalyse of variantieanalyse) en de behandeling van gegevens (gebruikte statistische toetsen en modellen);
- concentratie waarbij geen effect wordt waargenomen (NOEC); voor elke beoordeelde respons;
- laagste concentratie met waargenomen effecten (LOEC) voor elke beoordeelde respons (bij $p = 0,05$); EC_x voor elke beoordeelde respons, indien van toepassing, en betrouwbaarheidsintervallen (bv. 90 % of 95 %) en een grafiek van het gepaste model dat werd gebruikt om deze waarde te berekenen, de helling van de concentratie-responscurve, de formule van het regressiemodel, de geraamde modelparameters en de standaardfout daarvan.
- eventuele afwijkingen van de testmethode en afwijkingen van de aanvaardbaarheidscriteria en bespreking van mogelijke gevolgen voor de uitkomst van de test.

60. Voor de resultaten van eindpuntmetingen, moeten gemiddelde waarden en standaarddeviaties worden gepresenteerd (zo mogelijk per duplo en per concentratie).

LITERATUUR

- (1) OESO (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 171), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.
- (1) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. *Current Protocols in Toxicology* 39: 1-36.
- (2) OESO (2012b). 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.
- (3) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. *Water Research* 16: 457-464.
- (4) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1925-1930.
- (5) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2552-2560.
- (6) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17 β -Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Chemosphere* 47: 71-80.
- (7) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1692-1698.
- (8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-Tert-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1487-1496.
- (9) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. *Aquatic Toxicology* 79: 288-295.

- (10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. *Aquatic Toxicology* 77: 78-86.
- (11) Nakamura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Journal of Applied Toxicology* 35:11-23.
- (12) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Beschikbaar op: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html>.
- (13) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. *Chemosphere* 86: 593-599.
- (14) OESO (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 23), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.
- (15) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Aquatic Toxicology* 76: 69–92.
- (16) Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
- (17) Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Biology of Reproduction* 61: 1287-1293.
- (18) Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.
- (19) Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 330-338.
- (20) Hoofdstuk C.15 van deze bijlage, Vis, kortetermijn-toxiciteitstest op embryonale en larvestadia (sac-fry).

- (21) Hoofdstuk C.37 van deze bijlage, 21-daagse vistest: kortetermijnscreening op oestrogene en androgene activiteit en op aromataseremmers.
- (22) Hoofdstuk C.41 van deze bijlage, Geslachtelijke-ontwikkelingstest met vissen.
- (23) Hoofdstuk C.48 van deze bijlage, Test voor kortetermijneffecten op de voortplanting van vissen.
- (24) Hoofdstuk C.47 van deze bijlage, Test op toxiciteit bij vissen in vroege levensstadia.
- (25) Hoofdstuk C.49 van deze bijlage, Acute toxiciteitstest bij visembryo's (FET, Fish Embryo acute Toxicity test).
- (26) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067-1076.
- (27) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50: 301-308.
- (28) OESO (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 227). Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.
- (29) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Scharl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. *Genetics* 163: 245–251.
- (30) Shinomiya, A, Otake H, Togashi K, Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, *Zoological Science* 21: 613-619.
- (31) OESO (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Parijs.
- (32) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108-1116.

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Bezettingsgraad: het aantal vissen per volume water.

Chemische stof: een stof of een mengsel.

Concentratie waarbij geen effect wordt waargenomen (No Observed Effect Concentration, NOEC): de testconcentratie direct onder de LOEC, die in vergelijking met de controle geen statistisch significant effect heeft ($p < 0,05$) binnen een aangegeven blootstellingsperiode.

Densiteit: het natte gewicht van de vissen per volume water.

Doorstroomtest: een test waarbij de testoplossingen constant door het testsysteem stromen gedurende de blootstellingsduur.

ECx: (Effect concentration for x % effect) is de concentratie die binnen een bepaalde blootstellingstijd x % van een effect op testorganismen veroorzaakt ten opzichte van een controle. De EC50 is bijvoorbeeld de geschatte concentratie die gedurende een bepaalde blootstellingsperiode bij 50 % van een blootgestelde populatie een effect op een testeindpunt zal hebben.

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Fecunditeit: aantal eitjes;

Fertiliteit: aantal levensvatbare eitjes/fecunditeit;

HPG-as: hypothalamus-hypofyse-gonade-as.

IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.

Laagste concentratie met waargenomen effecten (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC): de laagste geteste concentratie van een teststof waarbij de chemische stof een statistisch significant effect ($p \leq 0,05$) heeft vergeleken met de controlegroep. Alle testconcentraties boven de LOEC moeten echter een schadelijk effect hebben dat gelijk is aan of groter dan de effecten die worden waargenomen bij de LOEC. Indien niet aan deze beide voorwaarden kan worden voldaan, moet uitgebreid worden toegelicht hoe de LOEC (en daarmee de NOEC) is geselecteerd. Aanhangsels 5 en 6 bevatten richtsnoeren hieromtrent.

Mediaan letale concentratie (LC50): de concentratie van een teststof waarvan geraamd

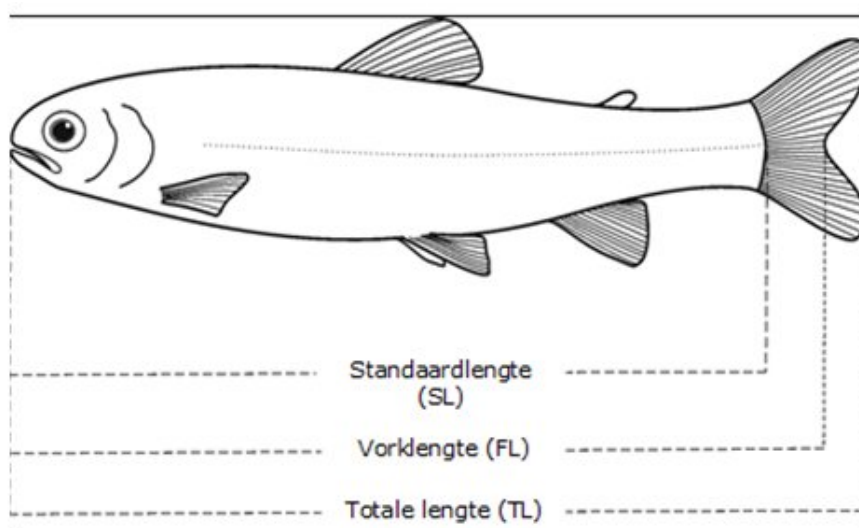
wordt dat zij binnen de testduur 50 % van de blootgestelde testorganismen doodt.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Standaardlengte (SL): de lengte van een vis, gemeten van het uiteinde van de bek tot het achtereinde van de laatste wervel of het achtereinde van het midlaterale deel van de hypurale plaat. Eenvoudig gesteld wordt de lengte van de staartvin in deze meting niet meegerekend. (www.fishbase.org)

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

Totale lengte (TL): de lengte van het uiteinde van de bek tot het uiteinde van de langste lob van de staartvin, gewoonlijk gemeten met de lobben samengedrukt langs de middenlijn. Dit is een meting in rechte lijn, die niet wordt gemeten over de welving van het lichaam (www.fishbase.org)



Figuur 1: beschrijving van de verschillende lengtes die worden gebruikt

Uitkomstpercentage: larven/aantal in een incubator gebrachte embryo's

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

Vorklengte (FL): de lengte van het uiteinde van de snuit tot het einde van de middenstraal van de staartvin, wordt gebruikt bij vissen waarbij het moeilijk is om te bepalen waar de wervelkolom ophoudt. (www.fishbase.org)

VTG: vitellogenine is een fosfolipoglycoproteïne precursor van eidooierproteïne die gewoonlijk voorkomt bij seksueel actieve vrouwtjes van alle ovipare soorten.

Wpf: weken na bevruchting

Aanhangsel 2**ENKELE CHEMISCHE KENMERKEN VAN GESCHIKT VERDUNNINGSWATER**

Stof	Drempelconcentratie
Vaste deeltjes	5 mg/l
Totaalgehalte aan organische koolstof	2 mg/l
Niet-geïoniseerde ammoniak	1 µg/l
Restchloorgehalte	10 µg/l
Totaal organofosforpesticiden	50 ng/l
Totaalgehalte aan organochloorpesticiden en polychloorbifenylen	50 ng/l
Totaalgehalte aan organisch chloor	25 ng/l
Aluminium	1 µg/l
Arseen	1 µg/l
Chroom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Koper	1 µg/l
IJzer	1 µg/l
Lood	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Zink	1 µg/l
Cadmium	100 ng/l
Kwik	100 ng/l
Zilver	100 ng/l

Aanhangsel 3**TESTOMSTANDIGHEDEN VOOR DE MEOGRT**

- | | |
|---|---|
| 1. Aanbevolen soort | Japanse rijstvisje (<i>Oryzias latipes</i>) |
| 2. Type test | Continue doorstroom |
| 3. Watertemperatuur | De nominale testtemperatuur is 25 °C. De gemiddelde temperatuur gedurende de test in elke bak is 24-26 °C. |
| 4. Belichtingskwaliteit | Fluorescente lampen (breed spectrum en ~150 lumen/m ²) (~150 lux).

16 uur licht, 8 uur donker |
| 6. Densiteit | F0: 2 volwassen dieren/duplo; F1: gestart met maximaal 20 eitjes (embryo's)/duplo, teruggebracht naar 12 embryo's/duplo bij uitkomen, dan 2 volwassen dieren (XX-XY broedpaartje) bij 9-10 wpf voor voortplantingsfase |
| 7. Minimaal bruikbaar volume testkamer | 1,8 l (bv. afmetingen testkamer: 18x9x15 cm) |
| 8. Volumewisselingen van testoplossingen | Minimaal 5 volumeverversingen/dag tot 16 volumeverversingen/dag (of 20 ml/min doorstroming) |
| 9. Leeftijd van testorganismen bij F0: > 12 wpf maar ouder dan 16 wpf niet aanbevolen start | |
| 10. Aantal organismen per duplo | F0: 2 vissen (paar mannetje-vrouwje); F1: maximaal 20 vissen (eitjes)/duplo (afkomstig van broedpaartjes F0 en F1). |
| 11. Aantal behandelingen | 5 behandelingen met teststof plus geschikte controle(s) |
| 12. Aantal duplo's per behandeling | Minimaal 6 duplo's per behandeling voor teststof en minimaal 12 duplo's voor controle, en oplosmiddelcontrole, indien toegepast (het aantal duplo's wordt verdubbeld binnen de voortplantingsfase in F1) |
| 13. Aantal organismen per test | Minimaal 84 vissen in F0 en 504 in F1. (Indien oplosmiddelcontrole wordt toegepast, dan 108 vissen in F0 en 648 in F1). De te tellen eenheid is het post-eleuthero-embryo. |
| 14. Voerschema | De vissen krijgen pekelkreeftjes, <i>Artemia</i> spp., (24 uur oude <i>nauplii</i>) naar believen, zo nodig aangevuld met in de handel verkrijgbare voervlokken (een voorbeeldvoerschema dat zorgt voor voldoende groei en ontwikkeling om een solide voorplanting te ondersteunen, is te vinden in aanhangsel 6). |

15. Beluchting	Geen, tenzij de concentratie opgeloste zuurstof < 60 % van de verzadigingswaarde van lucht nadert
16. Verdunningswater	Schoon oppervlakte- of bronwater, synthetisch water of onthoofd kraanwater.
17. Blootstellingsduur	In eerste instantie 19 weken (van F0 tot uitkomen F2)
18. Biologische eindpunten (primair)	Uitkomstpercentage (F1 en F2); overleving (F1, van uitkomen tot 4 wpf (einde larvaal/begin juveniel), van 4 tot 9 (of 10) wpf (begin juveniel tot subvolwassen) en van 9 tot 15 wpf (subvolwassen tot volwassen, tijdstip van doden)); groei (F1, lengte en gewicht bij 9 en 15 wpf); secundaire geslachtskenmerken (F1, anaalvinpapillen bij 9 en 15 wpf); vitellogenine (F1, <i>vgt</i> -mRNA of VTG-proteïne bij 15 wpf); fenotypisch geslacht (F1, a.d.h.v. histologie van de geslachtsklieren bij 15 wpf); voortplanting (F0 en F1, fecunditeit en fertiliteit gedurende 21 dagen); tijd tot kuitschieten (F1); en histopathologie (F1, geslachtsklieren, lever en nier bij 15 wpf)
19. Geldigheidscriteria voor de test	Opgeloste zuurstof > 60 % verzadigingswaarde van lucht; gemiddelde watertemperatuur van 24-26 °C gedurende de hele test; succesvolle voortplanting bij ≥ 65 % vrouwtjes in controlegroep(en); gemiddelde dagelijkse fecunditeit van ≥ 20 eitjes in controlegroep(en); uitkomstpercentage van ≥ 80 % (gemiddeld) in controlegroepen (in zowel F1 als F2); overleving na uitkomen tot 3 wpf van ≥ 80 % (gemiddeld) en van 3 wpf tot en met het einde voor de generatie van ≥ 90 % (gemiddeld) in de controlegroepen (F1), concentraties van de teststof in oplossing op bevredigende wijze binnen ± 20 % van de gemiddelde gemeten waarden.

Aanhangsel 4

RICHTSNOEREN VOOR NORMALE CONTROLEWAARDEN

Er zij op gewezen dat deze controlewaarden op een beperkt aantal valideringsstudies zijn gebaseerd en in het licht van voortschrijdende ervaring gewijzigd kunnen worden.

Groei

Voor alle vissen in de steekproef worden bij 9 (of 10) en bij 15 weken na bevruchting (weeks post fertilisation, wpf) gewichts- en lengtemetingen uitgevoerd. Als dit protocol wordt gevolgd, bedraagt het te verwachten natte gewicht bij 9 wpf 85-145 mg voor mannetjes en 95-150 mg voor vrouwtjes. Bij 15 wpf bedraagt het te verwachten gewicht 250-330 mg voor mannetjes en 280-350 mg voor vrouwtjes. Hoewel er voor afzonderlijke vissen aanmerkelijke afwijkingen van deze waarden kunnen voorkomen, kunnen gemiddelde gewichten in controlegroepen die ver buiten, en met name onder, deze bereiken liggen, een aanwijzing zijn voor problemen met voeding, temperatuurregeling, waterkwaliteit, ziekte of een combinatie van deze factoren.

Uitkomen

Het percentage uitkomende eitjes ligt in controlegroepen doorgaans rond de 90 %, al zijn percentages van niet meer dan 80 % niet ongebruikelijk. Als minder dan 75 % van de eitjes uitkomt, kan dat duiden op onvoldoende beweging van de zich ontwikkelende eitjes of onvoldoende zorgvuldige behandeling van de eitjes, zoals het niet tijdig verwijderen van dode eitjes met schimmelaantasting tot gevolg.

Overleving

De overlevingspercentages tot 3 wpf vanaf uitkomen en na 3 wpf zijn doorgaans 90 % of hoger voor controlegroepen, maar overlevingspercentages in vroege levensstadia van niet meer dan 80 % voor controlegroepen zijn niet verontrustend. Overlevingspercentages van minder dan 80 % zijn wel reden tot zorg en duiden mogelijk op onvoldoende reiniging van de aquaria leidend tot verlies van vislarven door ziekte of door verstikking als gevolg van lage gehalten opgeloste zuurstof. Sterfte kan ook het gevolg zijn van letsel tijdens het reinigen van de bak en door verlies van vislarven door het afvoersysteem van de bak.

Vitellogeninegen

Hoewel de absolute cijfers voor het *vitellogenine*-gen (*vtg*), uitgedrukt als kopieën/ng totaal mRNA, sterk uiteen kunnen lopen van laboratorium tot laboratorium naargelang van de gebruikte procedures en instrumentaria, moet de *vtg*-verhouding ten minste 200 maal groter zijn in controlevrouwtjes versus controlemannetjes. Het is niet ongebruikelijk dat deze verhouding waarden van 1 000 tot 2 000 bereikt, maar verhoudingen van minder dan 200 zijn verdacht en kunnen duiden op problemen met verontreiniging van het monster of problemen met de gebruikte procedure en/of reagentia.

Secundaire geslachtskenmerken

Voor mannetjes is het normale bereik van secundaire geslachtskenmerken, gedefinieerd als het totale aantal segmenten in de vinstralen van de anaalvinpapillen, 40-80 segmenten bij 9-10 wpf. Tegen 15 wpf moet het bereik voor controlemannetjes rond de 80-120 zijn, tegen 0 voor vrouwtjes. Om onbekende redenen komen er in zeldzame gevallen mannetjes voor zonder papillen bij 9 wpf, maar omdat alle controlemannetjes voor 15 wpf papillen ontwikkelen, is dit waarschijnlijk toe te schrijven aan vertraagde ontwikkeling. De aanwezigheid van papillen bij controlevrouwtjes betekent dat er XX-mannetjes in de populatie aanwezig zijn.

XX-mannetjes

Het lijkt erop dat de normale achtergrondincidentie van XX-mannetjes in kweek bij 25 °C rond de 4 % of minder ligt en toeneemt bij stijgende temperatuur. Er moeten maatregelen worden getroffen om het aandeel XX-mannetjes in de populatie zoveel mogelijk te beperken. Aangezien de incidentie van XX-mannetjes een genetische component lijkt te hebben en dus erfelijk is, kan door het kweekbestand steeds te controleren en te zorgen dat XX-mannetjes niet worden gebruikt voor de voortplanting van het kweekbestand, de incidentie van XX-mannetjes in de populatie doeltreffend worden beperkt.

Kuitschieten

Het kuitschieten in de controleduplo's moet dagelijks worden gecontroleerd alvorens over te gaan tot de beoordeling van de fecunditeit. De controlepaartjes kunnen visueel kwalitatief beoordeeld worden op bewijs van kuitschieten. De meeste controlepaartjes moeten kuitschieten voor 12-14 wpf. Lage aantallen kuitschietende paartjes tegen die tijd duiden op mogelijke problemen met de gezondheid, maturiteit of het welzijn van de vissen.

Fecunditeit

Gezonde, weldoorvoede rijstvisjes van 12-14 wpf schieten normaal gesproken dagelijks kuit, waarbij ze tussen de 15 en 50 eitjes per dag produceren. De eitjesproductie voor 16 van de 24 controlebroedpaartjes (> 65 %) moet hoger liggen dan 20 eitjes per paartje per dag en kan tot zo'n 40 eitjes per dag bedragen. Geringere aantallen kunnen een aanwijzing zijn voor onvolgroeide, ondervoede of ongezonde paartjes.

Fertiliteit

Het percentage vruchtbare eitjes voor controlepaartjes ligt meestal in de 90 %. Waarden van rond de 95 % of meer zijn niet ongebruikelijk. Fertiliteitscijfers van minder dan 80 % voor controle-eitjes zijn verdacht en kunnen duiden op hetzij ongezonde dieren, hetzij suboptimale kweekomstandigheden.

Aanhangsel 5

EEN VOORBEELD VAN EEN GESCHIKT VOERSHEMA

In tabel 1 is een voorbeeld weergegeven van een voerschema om voor voldoende groei en ontwikkeling om een solide voorplanting te ondersteunen. Het kan aanvaardbaar zijn om van dit voerschema af te wijken, maar daarbij wordt wel aanbevolen deze afwijkingen eerst te testen om na te gaan dat aanvaardbare groei en voortplanting wordt waargenomen. Om het voorgestelde voerschema te volgen moet voor het begin van de test het drooggewicht pekelkreeftjes per volume pekelkreeftjessuspensie worden bepaald. Dit kan worden gedaan door een bepaald volume pekelkreeftjessuspensie te wegen, nadat deze gedurende 24 uur bij 60 °C gedroogd is in vooraf gewogen schaaltes. Om het gewicht van de zouten in de suspensie te bepalen moet een gelijk volume van dezelfde zoutoplossing als voor de suspensie wordt gebruikt, eveneens worden gedroogd en gewogen, waarna het gewicht wordt afgetrokken van dat van de gedroogde pekelkreeftjessuspensie. Een alternatieve methode is om de pekelkreeftjes voor het drogen te filteren en te spoelen met gedestilleerd water, zodat het niet nodig is het gewicht van de "zoutblanco" te bepalen. Aan de hand van deze informatie worden de waarden in de tabel voor drooggewicht pekelkreeftjes omgerekend naar het volume pekelkreeftjessuspensie dat per vis gevoerd moet worden. Bovendien wordt aanbevolen om wekelijks porties pekelkreeftjessuspensie te wegen om te verifiëren dat het correcte drooggewicht pekelkreeftjes gevoerd wordt.

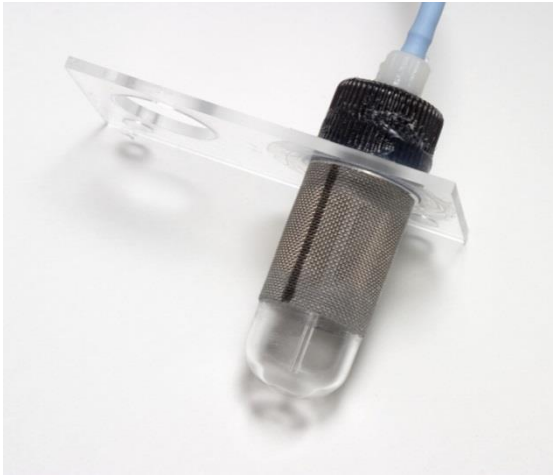
Tabel 1: Voorbeeld van een voerschema

Tijd (na uitkomen)	Pekelkreeftjes (mg drooggewicht/vis/dag)
Dag 1	0,5
Dag 2	0,5
Dag 3	0,6
Dag 4	0,7
Dag 5	0,8
Dag 6	1,0
Dag 7	1,3
Dag 8	1,7
Dag 9	2,2
Dag 10	2,8
Dag 11	3,5
Dag 12	4,2
Dag 13	4,5
Dag 14	4,8
Dag 15	5,2
Dagen 16-21	5,6
Week 4	7,7
Week 5	9,0
Week 6	11,0
Week 7	13,5
Week 8-doden	22,5

Aanhangsel 6

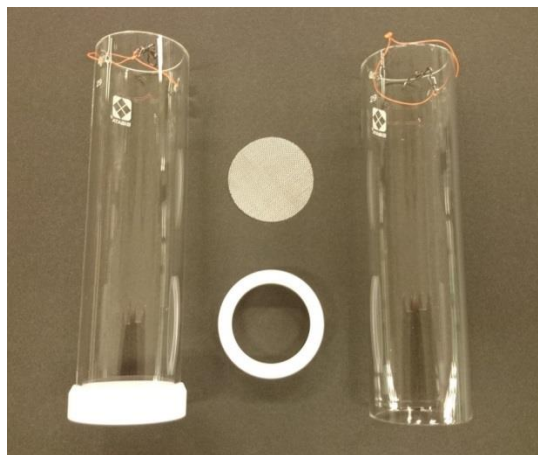
VOORBEELDEN VAN EEN EITJESINCUBATIEKAMER

Voorbeeld A



Deze incubator bestaat uit een dwars doorgesneden glazen centrifugeerbuisje, bijeengehouden door een roestvrijstalen huls en op zijn plaats gehouden door de centrifugeschroefdop. Door de dop steekt een dun glazen of roestvrijstalen buisje tot vlak boven de ronde bodem, dat zachtjes lucht doorblaast om de eitjes in suspensie te houden, waardoor de overdracht van infecties van saprofytische schimmels tussen de eitjes wordt beperkt en tegelijkertijd de chemische uitwisseling tussen de incubator en de omringende bak wordt bevorderd.

Voorbeeld B



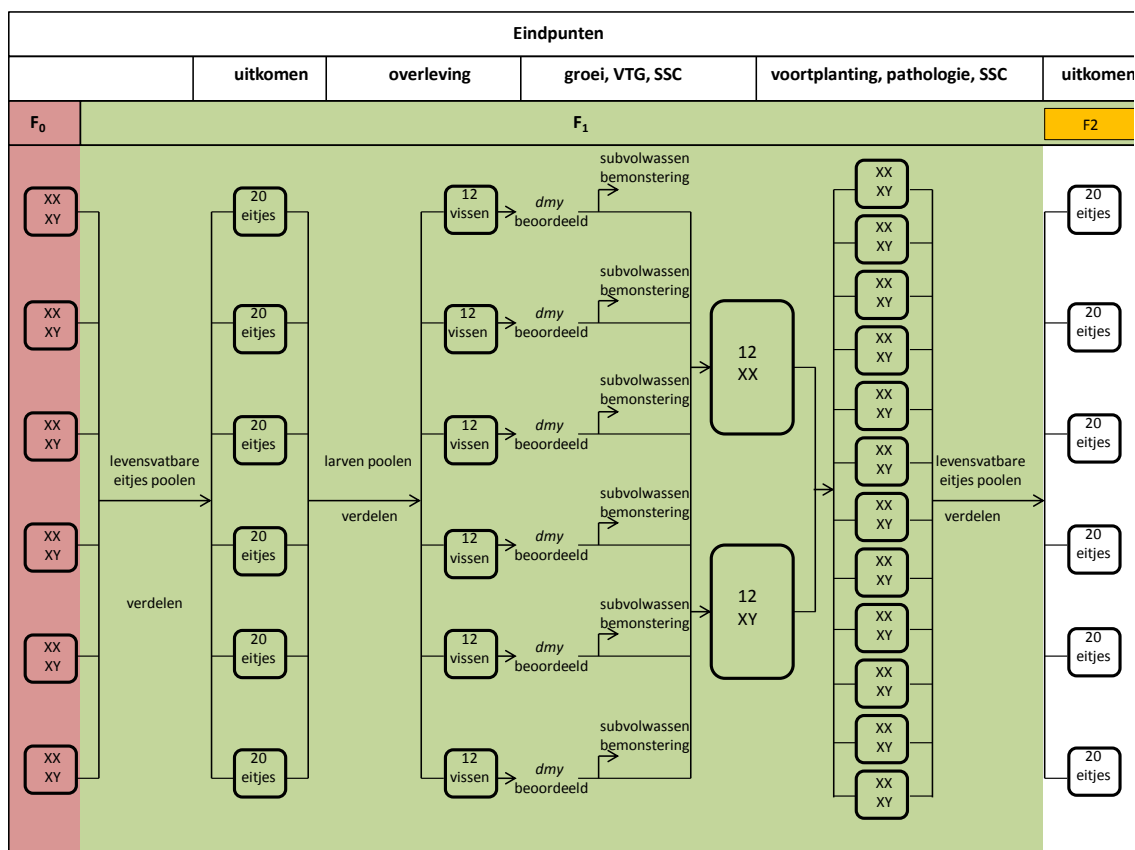


Deze incubator bestaat uit een glazen cilinder zonder bodem (met een doorsnede van 5 cm en een hoogte van 10 cm) waarbij met behulp van een PTFE ring roestvrijstalen gaas (0,25 ϕ en 32 mesh) aan de onderkant is bevestigd. De incubators worden aan de draagarm in bakken gehangen en verticaal geschud (met een amplitude van ongeveer 5 cm) in een cyclus die geschikt is voor rijstviseitjes (ongeveer elke 4 s).

Aanhangsel 7

SCHEMATISCH DIAGRAM VOOR HET POOLEN EN HERVERDELEN VAN DUPLOBEPALINGEN GEDURENDE DE MEOGRT-TESTMETHODE

Figuur 1: Poolen en herverdelen van duplobepalingen gedurende de MEOGRT. In de figuur is één behandeling of de helft van een controle weergegeven. Door het poolen blijven de duplo's niet gedurende de hele test identiek. NB: met de term 'eitjes' worden levensvatbare, bevruchte eitjes (equivalent aan embryo's) bedoeld.



Behandelingen en replicatie.

In de testmethode wordt aanbevolen vijf behandelingen met teststof toe te passen met gebruik van technisch zuiver materiaal en een negatieve controle. Het aantal duplo's per behandeling blijft niet constant gedurende de MEOGRT en het aantal duplo's in de controlebehandeling is het dubbele van elke afzonderlijke teststofbehandeling. In F₀ zijn er voor elke teststofbehandeling zes duplo's, terwijl er voor de negatievecontrolebehandeling 12 duplo's zijn. Het gebruik van oplosmiddelen wordt sterk afgeraden. Indien er toch een oplosmiddel wordt gebruikt, moet in het MEOGRT-verslag een motivering worden opgenomen van zowel het gebruik als de keuze ervan. Bovendien zijn er bij gebruik van een oplosmiddel twee typen controles nodig: a) een oplosmiddelcontrole en b) een negatieve

controle. Deze twee controlegroepen moeten elk op alle punten van het MEOGRT-tijdschema een volledige set duplo's vormen. Deze duplostructuur blijft gedurende de hele ontwikkeling van het testorganisme in de F1-generatie (en F2 tot uitkomen) gelijk. Wanneer echter in het volwassen stadium de F1-broedpaartjes worden gevormd, is het het beste om het aantal duplo-voortplantingspaartjes per behandeling te verdubbelen; er zijn dan dus 12 duplopaartjes per teststofbehandeling en 24 in de controlegroep (en zo nodig nog eens 24 duplopaartjes in de oplosmiddelcontrole). De bepaling van het uitkomen van embryo's afkomstig van de F1-paartjes wordt uitgevoerd met dezelfde duplostructuur als voor de embryo's afkomstig van de F0-paartjes, d.w.z. in eerste instantie zes duplo's per teststofbehandeling en 12 duplo's in de controlegroep(en).

Aanhangsel 8

HET TELLEN VAN ANAALVINPAPILLEN

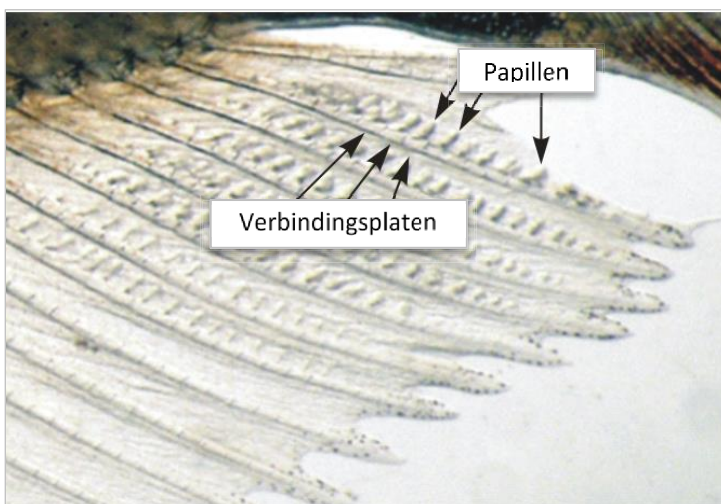
Voornaamste materialen en reagentia

- Stereomicroscop (met optioneel toegevoegde camera)
- Fixeermiddel (bv. van Davidson (Bouin wordt afgeraden)) indien niet van beeld wordt geteld.

Procedures

Na obductie moet een beeld worden verkregen van de anaalvin om gemakkelijk de anaalvinpapillen te kunnen tellen. Hoewel beeldvorming de aanbevolen methode is, kan de anaalvin ook gedurende ongeveer 1 minuut worden gefixeerd met Davidson-fixeermiddel of een ander geschikt fixeermiddel. Om de papillen gemakkelijker te kunnen tellen is het van belang de anaalvin gedurende de fixatie plat te houden. Het karkas met de anaalvin kan tot de analyse in Davidson-fixeermiddel of een ander geschikt fixeermiddel worden bewaard. Tel het aantal verbindingsplaten (zie **Figuur 1**) met papillen die uitsteken vanuit de achterrand van de verbindingsplaat.

Figuur 1: Anaalvinpapillen



Aanhangsel 9

UITGEBREID TIJDSHEMA VOOR MEOGRT

Testweken 1-3 (F0)

De kuitschietende vissen van de F0-generatie die aan de selectiecriteria voldoen (zie punt 16-20), worden drie weken lang blootgesteld, zodat zich ontwikkelende gameten en geslachtsklierweefsels aan de teststof worden blootgesteld. In elke duplobak zit één vissenpaartje (broedpaartje van XX-vrouwje en XY-mannetje). De afgezette eitjes worden gedurende 21 achtereenvolgende dagen, vanaf Testdag 1, verzameld, geteld en beoordeeld op fertiliteit.

Testweek 4 (F0 en F1)

Bevruchte en levensvatbare eitjes (embryo's) worden bij voorkeur op één dag verzameld; als er evenwel niet genoeg embryo's zijn, mogen de embryo's over twee dagen worden verzameld. In dat geval worden alle embryo's binnen de behandelingen die op de eerste dag zijn verzameld, gepoold met de embryo's die op de tweede dag zijn verzameld. Alle gepoolde embryo's voor elke behandeling worden dan willekeurig verdeeld over elk van de duplo-incubators met 20 embryo's per incubator. Elke dag wordt de sterfte onder bevruchte eitjes (embryo's) gecontroleerd en geregistreerd. Dode eitjes worden uit de incubators verwijderd (bij bevruchte eitjes is sterfte met name in de eerste stadia duidelijk te herkennen aan het feit dat ze duidelijk minder doorzichtig zijn en van kleur veranderen als gevolg van coagulatie en/of precipitatie van proteïne, hetgeen resulteert in een wit ondoorschijnend uiterlijk; OESO 210).

Opmerking: zodra voor één behandeling een tweede dag embryo's moeten worden verzameld, moet deze procedure voor alle behandelingen (inclusief de controles) worden gevolgd. Zijn er na de tweede verzameldag nog onvoldoende embryo's binnen een behandeling voor een belading van 20 embryo's per incubator, verminder dan de belading voor die afzonderlijke behandeling tot 15 embryo's per incubator. Zijn er niet genoeg embryo's voor een belading van 15 embryo's per incubator, verminder dan het aantal duplo-incubators tot er voldoende embryo's zijn voor 15 per incubator. Daarnaast zouden er meer broedpaartjes per behandeling en controles kunnen worden toegevoegd in F0 om meer eitjes te produceren en zo aan de aanbevelen 20 per duplo-incubator te komen.

Op Testdag 24 worden de F0-broedpaartjes op humane wijze gedood en worden gewicht en lengte geregistreerd. Indien nodig kunnen de F0-broedpaartjes nog 1-2 dagen extra worden gehouden om F1 opnieuw te starten.

Testweken 5-6 (F1)

Stop of beperk een of twee dagen voordat de eitjes naar verwachting zullen gaan uitkomen, de beweging van de incuberende eitjes om het uitkomen te bespoedigen. Naarmate er elke dag embryo's uitkomen, worden de larven gepoold per behandeling en systematisch

verdeeld over elke larvenbak binnen een bepaalde behandeling met niet meer dan 12 larven. Hiertoe worden er willekeurig larven geselecteerd en wordt er steeds één larve in de achtereenvolgende duplo's geplaatst volgens een aselechte procedure waarbij de verschillende behandelingsduplo's één voor één worden afgegaan tot alle duplo's binnen de behandeling 12 larven tellen. Zijn er onvoldoende larven om alle duplo's te vullen, zorg dan dat zoveel mogelijk duplo's 12 larven tellen om de F1-fase te beginnen.

De eitjes die na tweemaal de mediane dag waarop eitjes uitkomen in de controlegroep, nog niet zijn uitgekomen, worden als niet-levensvatbaar beschouwd en afgevoerd. Het aantal larven wordt geregistreerd en voor elke duplo wordt het uitkomstpercentage berekend.

Testweken 7-11 (F1)

In alle duplo's wordt dagelijks de overleving van de vissenlarven gecontroleerd en geregistreerd. Op Testdag 43 wordt voor elke duplo het aantal overlevende vissen geregistreerd, evenals het oorspronkelijke aantal in de duplo geplaatste larven (nominaal twaalf). Aan de hand hiervan kan het overlevingspercentage van uitkomen tot het subvolwassen stadium worden berekend.

Testweken 12-13 (F1)

Op Testdagen 78-85 wordt bij elke vis een klein monster van de staartvin genomen om bij alle vissen het genotypische geslacht te bepalen (d.w.z. er wordt een stukje van de vin afgeknipt). Deze informatie wordt gebruikt om broedpaartjes te vormen.

Binnen drie dagen nadat het genotypische geslacht van elke vis is bepaald, worden er willekeurig 12 broedpaartjes per behandeling en 24 paartjes per controle gevormd. In elke duplobak worden willekeurig twee XX- en XY-vissen geselecteerd, vervolgens gepoold op geslacht en dan willekeurig geselecteerd om een broedpaartje te vormen (d.w.z. een XX-XY-paartje). Er worden ten minste 12 duplo's opgezet per chemische behandeling en ten minste 24 duplo's voor de controle, met elk één broedpaartje. Als er in een duplo niet hetzij twee XX-vissen hetzij twee XY-vissen beschikbaar zijn voor het poolen, moeten vissen met het benodigde geslachtsgenotype uit andere duplo's binnen de behandeling worden verkregen.

De overgebleven vissen (maximaal 8 vissen per duplo) worden op humane wijze gedood en bemonsterd voor de verschillende subvolwassen eindpunten. Voor alle monsters van subvolwassen vissen worden de *dmy*-gegevens (XX of XY) geregistreerd om er zeker van te zijn dat alle eindpuntgegevens in verband kunnen worden gebracht met het genetische geslacht van elke afzonderlijke vis.

Testweken 13-14 (F1)

De subvolwassen broedpaartjes worden verder blootgesteld naarmate ze zich ontwikkelen tot volwassen dieren. Op Testdag 98 (d.w.z. de dag voordat begonnen wordt met het verzamelen van eitjes) worden de eitjes zowel uit de aquaria als uit de vrouwtjes verwijderd.

Testweken 15-17 (F1)

Voor elke duplo worden de afgezette eitjes gedurende 21 achtereenvolgende dagen dagelijks verzameld en op fecunditeit en fertiliteit beoordeeld.

Testweek 18 (herhaling van Testweek 4) (F1 en F2)

Op Testdag 120 worden 's morgens in elke duplobak de eitjes verzameld. De verzamelde eitjes worden beoordeeld en de (van draden ontdane) bevruchte eitjes van elk van de broedpaartjes worden per behandeling gepoold en systematisch verdeeld over eitjesincubatiekamers met 20 bevruchte eitjes per incubator. De incubators kunnen in aparte "incubatorbakken" worden geplaatst die voor elke behandeling zijn klaargezet, of in de duplobak waar na het uitkomen de uitgekomen larven in zullen komen. Embryo's worden bij voorkeur op één dag verzameld; als er evenwel niet genoeg embryo's zijn, mogen de embryo's over twee dagen worden verzameld. In dat geval worden alle embryo's binnen de behandelingen die op de eerste dag zijn verzameld, gepoold met de embryo's die op de tweede dag zijn verzameld. Alle gepoolde embryo's voor elke behandeling worden dan willekeurig verdeeld over elk van de duplo-incubators met 20 embryo's per incubator. Opmerking: zodra voor één behandeling een tweede dag embryo's moeten worden verzameld, moet deze procedure voor alle behandelingen (inclusief de controles) worden gevolgd. Zijn er na de tweede verzameldag onvoldoende embryo's voor een behandeling voor een belading van 20 embryo's per incubator, verminder dan de belading voor die afzonderlijke behandeling tot 15 embryo's per incubator. Zijn er niet genoeg embryo's voor een belading van 15 embryo's per incubator, verminder dan het aantal duplo-incubators tot er voldoende embryo's zijn voor 15 per incubator.

Op Testdag 121 (of Testdag 122 om er zeker van te zijn dat F2 goed en wel begonnen is), worden de broedpaartjes van F1 op humane wijze gedood en geanalyseerd voor de volwassen eindpunten. Indien nodig kunnen de F1-broedpaartjes nog 1-2 dagen extra worden gehouden om F2 opnieuw te starten.

Testweken 19-20 (F2)

Stop of beperk een of twee dagen voordat de eitjes naar verwachting zullen gaan uitkomen, de beweging van de incuberende eitjes om het uitkomen te bespoedigen. Als de test wordt afgerond tegen het einde van het uitkomen van F2, worden de larven dagelijks geteld en afgevoerd. (Embryo's die na een verlengde incubatietijd, gedefinieerd als tweemaal de mediane dag waarop eitjes uitkomen in de controlegroep, nog niet zijn uitgekomen worden als niet-levensvatbaar beschouwd).

Aanhangsel 10

STATISTISCHE ANALYSE

De typen biologische gegevens die in de MEOGRT worden gegenereerd, zijn vergelijkbaar met die uit andere tests en behalve voor de pathologische gegevens zijn er veel geschikte statistische methoden ontwikkeld om vergelijkbare gegevens naar behoren te analyseren, afhankelijk van de kenmerken van de gegevens, zoals normale verdeling, homogene variantie, of de onderzoeksopzet zich leent voor hypothesetoetsing of regressieanalyse, parametrische versus niet-parametrische toetsen enz. Over het algemeen worden voor de voorgestelde statistische analyses de aanbevelingen van de OESO voor milieugiftigheidsgegevens (OESO, 2006) gevolgd. In figuur 2 is een beslissingsdiagram voor de analyse van MEOGRT-gegevens weergegeven.

Aangenomen wordt dat de gegevenssets meestal monotone responsen zullen laten zien. Daarnaast moet de vraag of een eenzijdige of een tweezijdige statistische toets moet worden gebruikt, worden beantwoord. Tenzij er biologische redenen zijn waarom een eenzijdige toets ongeschikt zou zijn, wordt aanbevolen om eenzijdige toetsen te gebruiken. In de volgende paragraaf worden bepaalde statistische toetsen aanbevolen, maar als er geschiktere en/of krachtigere statistische methoden worden ontwikkeld voor toepassing op de specifieke gegevens die in de MEOGRT worden gegenereerd, kunnen die statistische toetsen worden gebruikt om van die voordelen te profiteren.

MEOGRT-gegevens moeten voor elk genotypisch geslacht afzonderlijk worden geanalyseerd. Er zijn twee strategieën om van geslacht veranderde vissen (XX-mannetjes en XY-vrouwtjes) te analyseren. 1) Alle gegevens over van geslacht veranderde vissen in de hele test censureren, behalve de prevalentie van geslachtsverandering voor elke duplobepaling. 2) De gegevens over alle van geslacht veranderde vissen in de gegevensset laten en ze analyseren op basis van genotype.

Histopathologiegegevens

Histopathologiegegevens worden gerapporteerd als ernstscores en beoordeeld aan de hand van een nieuw ontwikkelde statistische procedure: de Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS), (Green *et al.*, 2014). De *Rao-Scott*-correctie behoudt test-replicatie-informatie; de *by Slices*-procedure verdisconteert de biologische verwachting dat de ernstscores doorgaans stijgen met toenemende behandelingsconcentraties. Voor elke diagnose specificeert de output van de RSCABS welke behandelingen een hogere pathologieprevalentie hebben dan controles en het bijbehorende ernstniveau.

Fecunditeitsgegevens

Voor analyses voor fecunditeitsgegevens wordt een stap-omlaag-trendtoets van Jonckheere-Terpstra of Williams-toets gebruikt om de effecten van de behandeling te bepalen, mits de gegevens consistent zijn met een monotone concentratierespons. Met een stap-omlaagtoets worden alle vergelijkingen gemaakt bij een significantieniveau van 0,05 en wordt niet

gecorrigeerd voor het aantal gemaakte vergelijkingen. Verwacht wordt dat de gegevens consistent zijn met een monotone concentratierespons, maar dit kan worden geverifieerd door hetzij visuele inspectie van de gegevens, hetzij het berekenen van lineaire en kwadratische contrasten van de behandelingsgemiddelden na een rangordetransformatie van de gegevens. Behalve als het kwadratische contrast significant is en het lineaire niet, wordt de trendtoets toegepast. In het andere geval wordt, als de gegevens normaal verdeeld zijn met homogene varianties, de toets van Dunnett gebruikt om de behandelingseffecten te bepalen. Als niet aan die voorwaarden wordt voldaan, wordt de Dunn-toets met correctie volgens Bonferroni-Holm gebruikt. Alle aangegeven toetsen worden onafhankelijk van een eventuele F- of Kruskal-Wallis-toets toegepast. Nadere bijzonderheden zijn opgenomen in OESO 2006.

Er mogen alternatieve methoden worden gebruikt, zoals een gegeneraliseerd lineair model met 'Poisson errors' voor eitjestellingen (zonder transformatie), indien statistisch onderbouwd (Cameron en Trividi, 2013). Bij gebruik van een alternatieve benadering wordt aanbevolen statistisch advies in te winnen.

Dagelijkse eitjestelling binnen één generatie

De formule voor het ANOVA-model (variantieanalyse) is $Y = \text{Tijd} * \text{Tijd} + \text{Behandeling} + * \text{Behandeling} + \text{Tijd} * \text{Behandeling} + * \text{Tijd} * \text{Behandeling}$, met random effecten van Duplo(Generatie*Behandeling) en Tijd*Duplo(Behandeling), met ruimte voor ongelijke variantiecomponenten van beide typen over meerdere generaties. De Tijd verwijst hier naar de frequentie van de eitjestellingen (d.w.z. Dag of Week). Dit is een analyse voor herhaalde metingen, waarbij het herhaalde-metingen-karakter van de gegevens is toe te schrijven aan de correlaties tussen waarnemingen aan dezelfde duplo's.

De hoofdeffecten van behandeling worden getoetst aan de hand van de toets van Dunnett (of Dunnett-Hsu), die corrigeert voor het aantal vergelijkingen. Er moet ook worden gecorrigeerd voor het hoofdeffect van generatie of tijd, want voor deze twee factoren is er geen "controle"-niveau en elk paar niveaus is een vergelijking van mogelijk belang. Voor deze twee hoofdeffecten geldt dat als de F-toets voor het hoofdeffect significant is bij een niveau van 0,05, de paarsgewijze vergelijkingen tussen niveaus van die factor zonder verdere correctie bij een niveau van 0,05 getoetst kunnen worden.

Het model omvat zowel bi- als trifactoriële interacties, zodat een hoofdeffect voor bv. tijd mogelijk niet significant is, ook al heeft tijd een significante impact op de resultaten. Als een bi- of trifactoriële interactie waarbij de tijd is betrokken, significant is bij een niveau van 0,05, dan kunnen de vergelijkingen van niveaus van tijd bij een significantieniveau van 0,05 zonder verdere correctie worden aanvaard.

Vervolgens worden F-toetsen toegepast voor de significantie van de behandeling binnen de tijd, de zogenaamde "Slices" in de ANOVA-tabel. Is de Slice voor behandeling binnen F1 en tijd 12 bijvoorbeeld significant bij een niveau van 0,05, dan kunnen de paarsgewijze vergelijkingen voor behandeling binnen F1 en tijd 12 zonder verdere correctie worden aanvaard op een niveau van 0,05. Hetzelfde geldt mutatis mutandis voor tijd binnen F1 en

behandeling en voor generatie binnen een tijd en behandeling.

Tot slot moeten vergelijkingen die niet onder een van de voornoemde categorieën vallen, worden gecorrigeerd aan de hand van de correctie op de p-waarden volgens Bonferroni-Holm. Meer informatie over analyses van zulke modellen is te vinden in Hocking (1985) en Hochberg en Tamhane (1987).

Een andere mogelijkheid is om de ruwe gegevens te registreren en in het onderzoeksverslag te presenteren als fecunditeit (aantal eitjes) per duplo voor elke dag. Het duplogemiddelde van de ruwe gegevens moet dan worden berekend nadat een vierkantsworteltransformatie is toegepast. Een eenzijdige ANOVA op de getransformeerde duplogemiddelden moet worden berekend, gevolgd door Dunnett-contrasten. Het kan ook nuttig zijn om de fecunditeitsgegevens van elke behandeling en/of duplo visueel te inspecteren met een puntenwolk die de gegevens in de loop van de tijd weergeeft. Dit maakt een informele beoordeling van potentiële effecten in de loop van de tijd mogelijk.

Alle overige biologische gegevens

Bij de statistische analyses wordt ervan uitgegaan dat de gegevens bij een goed gekozen dosis monotoon zijn. Aangenomen wordt dus dat de gegevens monotoon zijn en ze worden met behulp van lineaire en kwadratische contrasten op monotoniteit beoordeeld. Zijn de gegevens inderdaad monotoon, dan wordt een trendtoets van Jonckheere-Terpstra op de duplomedianen (zoals geadviseerd in OESO 2006) aanbevolen. Als het kwadratische contrast significant is en het lineaire niet, worden de gegevens als niet-monotoon beschouwd.

Als de gegevens niet-monotoon zijn, vooral vanwege de beperkte respons van de hoogste behandeling of de hoogste twee behandelingen, moet overwogen worden de gegevensset te censureren, zodat de analyse zonder die behandelingen wordt uitgevoerd. Dit besluit moet worden genomen op basis van professioneel oordeel en alle beschikbare gegevens, in het bijzonder gegevens die wijzen op openlijke toxiciteit bij die behandelingsniveaus.

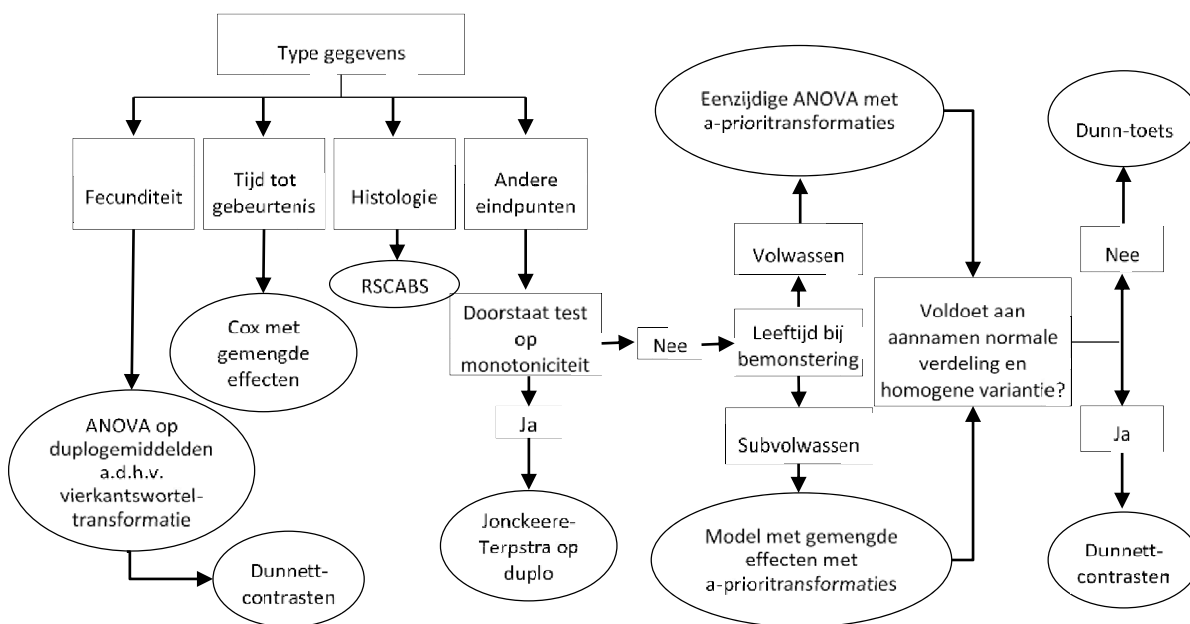
Voor gewicht en lengte wordt aanbevolen geen transformaties toe te passen, hoewel dit in een enkel geval wel nodig kan zijn. Voor de vitellogenine-gegevens wordt een log-transformatie aanbevolen; voor de SSC-gegevens (anaalvinpapillen) wordt een vierkantsworteltransformatie aanbevolen; voor de gegevens over percentage eitjes dat uitkomt, percentage overleving, geslachtsverhouding en percentage vruchtbare eitjes wordt een hoektransformatie aanbevolen. De tijd tot uitkomen en de tijd tot eerste keer kuitschieten moeten worden behandeld als gegevens van het type tijd-tot-gebeurtenis, waarbij afzonderlijke embryo's die niet uitkomen in de omschreven periode of duplo's die nooit kuitschieten worden behandeld als rechtsgecensureerde gegevens. De tijd tot uitkomen moet worden berekend op basis van de mediane dag van uitkomen van elke duplo. Deze eindpunten moeten worden geanalyseerd met behulp van een proportioneel-risicomodel van Cox met gemengde effecten.

De biologische gegevens van monsters van volwassen vissen bestaan uit één meting per

duplo, d.w.a. er zijn één XX-vis en één XY-vis per duploaquarium. Daarom wordt aanbevolen een eenzijdige ANOVA uit te voeren op de duplogemiddelden. Als aan de aannamen van de ANOVA (normale verdeling en homogene variantie zoals beoordeeld op basis van de residuen van de ANOVA met respectievelijk de toets van Shapiro-Wilks en de toets van Levene) wordt voldaan, moeten Dunn-contrasten worden gebruikt om te bepalen welke behandelingen verschilden van de controle. Wordt daarentegen niet aan de aannamen van de ANOVA voldaan, dan moet een Dunn-toets worden gedaan om te bepalen welke behandelingen verschilden van de controle. Een vergelijkbare procedure wordt aanbevolen voor gegevens in de vorm van percentages (fertiliteit, uitkomen, overleving).

Voor de biologische gegevens van monsters van subvolwassen vissen zijn er 1 tot 8 metingen per duplo, d.w.z. voor elk genotypisch geslacht kunnen er uiteenlopende aantallen vissen zijn die bijdragen aan het duplogemiddelde. Aanbevolen wordt daarom dat een ANOVA-model met gemengde effecten wordt gebruikt, gevolgd door Dunn-contrasten, indien aan de aannamen inzake normale verdeling en homogene variantie wordt voldaan (op de residuen van de ANOVA met gemengde effecten). Is dit niet het geval, dan moet een Dunn-toets worden gedaan om te bepalen welke behandelingen verschilden van de controle.

Figuur 2: Stroomschema voor de aanbevolen statistische procedures voor analyse van de gegevens uit de MEOGRT.



Literatuur

- (1) OESO (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Parijs.

- (2) Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.
- (3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.
- (4) Hochberg Y and Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

C.53 GROEI- EN ONTWIKKELINGSTEST BIJ AMFIBIELARVEN (LARVAL AMPHIBIAN GROWTH AND DEVELOPMENT ASSAY, LAGDA)

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 241 (2015) van de OESO. De behoefte om een test te ontwikkelen en te valideren voor het bepalen en karakteriseren van de schadelijke gevolgen van blootstelling aan toxische stoffen bij amfibieën komt voort uit bezorgdheid dat de gehalten aan chemische stoffen in het milieu schadelijke effecten kunnen veroorzaken bij zowel mensen als dieren. In de OESO-testrichtlijn van de Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA, groei- en ontwikkelingstest bij amfibielarven) wordt een toxiciteitstest beschreven met een amfibiesoort waarbij gekeken wordt naar de groei en ontwikkeling vanaf de bevruchting tot en met de vroeg-juvenile periode. In de test (die over het algemeen 16 weken duurt) worden de vroege ontwikkeling, metamorfose, overleving, groei en gedeeltelijke rijping van het voortplantingssysteem beoordeeld. Bovendien kan een reeks andere eindpunten worden gemeten met het oog op een diagnostische beoordeling van stoffen waarvan wordt vermoed dat ze hormoonontregelende stoffen zijn of andere typen stoffen met toxische effecten op de ontwikkeling en de voortplanting. De in deze testmethode beschreven methode is afgeleid van valideringsstudies op de Afrikaanse klauwkikker (*Xenopus laevis*) door het Amerikaanse Environmental Protection Agency (U.S. EPA) met ondersteunende werkzaamheden in Japan (1). Hoewel ook andere amfibiesoorten geschikt kunnen zijn voor een groei- en ontwikkelingstestprotocol waarbij bepaald kan worden of het genetische geslacht een belangrijke component is, zijn de specifieke methoden en observationele eindpunten die in deze testmethode worden beschreven, uitsluitend van toepassing op *Xenopus laevis*.
2. De LAGDA wordt gebruikt als een aanvullende test met een amfibie om vollediger concentratie-responsgegevens te verzamelen voor schadelijke effecten die vervolgens gebruikt kunnen worden voor de omschrijving en karakterisering van gevaren en ter beoordeling van het ecologisch risico. In het conceptueel kader van de OESO voor het testen en beoordelen van hormoonontregelende stoffen valt de LAGDA onder niveau 4, terwijl in-vivotests ook gegevens opleveren over schadelijke effecten op eindpunten die relevant zijn voor het endocrien systeem (2). De algemene opzet van het experiment houdt in dat *X. laevis*-embryo's in stadium 8-10 volgens Nieuwkoop en Faber (NF) (3) worden blootgesteld aan ten minste vier verschillende concentraties van de teststof (over het algemeen met ten minste half-logaritmische intervallen) en een of meer controlegroepen tot 10 weken na de mediane tijd tot NF-stadium 62 in de controle, met één tussentijdse subbemonstering in NF-stadium 62 (≤ 45 dagen na bevruchting (days post fertilisation,

dpf); doorgaans op ongeveer 45 dpf. Er zijn vier duplo's voor elke testconcentratie met acht duplo's voor de controle. De eindpunten die gedurende de blootstelling worden beoordeeld (bij de tussentijdse subbemonstering en de eindbemonstering bij het einde van de test), zijn onder meer de eindpunten die indicatief zijn voor gegeneraliseerde toxiciteit: sterfte, afwijkend gedrag en groeibepalingen (lengte en gewicht), evenals eindpunten voor het karakteriseren van specifieke endocrien toxische werkingsmechanismen op fysiologische processen waarbij oestrogenen, androgenen of schildklierhormonen een rol spelen. De methode is in de eerste plaats gericht op potentiële effecten die relevant zijn op populatieniveau (te weten schadelijke effecten op overleving, ontwikkeling, groei en reproductieve ontwikkeling) met het oog op de berekening van een concentratie waarbij geen effect wordt waargenomen (No Observed Effect Concentration, NOEC) of een concentratie waarbij een x % effect wordt waargenomen (Effect Concentration, ECx) voor het gemeten eindpunt. Er zij evenwel op gewezen dat ECx-benaderingen zelden geschikt zijn voor dit type grootschalige onderzoeken waarbij verhoging van het aantal testconcentraties ter bepaling van de gewenste ECx niet werkbaar is. Bovendien moet worden opgemerkt dat de methode de voortplantingsfase zelf niet bestrijkt. De in deze testmethode gebruikte definities staan in aanhangsel 1.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

3. Omdat er bij de validering van deze tamelijk complexe test slechts een beperkt aantal stoffen is getest en een beperkt aantal laboratoria betrokken was, is met name de interlaboratorium-reproduceerbaarheid voorsnag niet met experimentele gegevens gedocumenteerd. Verwacht wordt dat zodra er voldoende onderzoeken beschikbaar zijn om zekerheid te krijgen over het effect van deze nieuwe onderzoeksopzet, OESO-testrichtlijn 241 opnieuw tegen het licht zal worden gehouden en zo nodig zal worden herzien in het licht van de opgedane ervaringen. De LAGDA is een belangrijke test voor het bestuderen van factoren die mogelijk bijdragen aan afnamen van amfibieënpopulaties, door de effecten te bestuderen van de blootstelling aan stoffen gedurende het gevoelige larvestadium, waarin effecten op de overleving en de ontwikkeling, waaronder de normale ontwikkeling van de voortplantingsorganen, schadelijke gevolgen kunnen hebben voor populaties.
4. De test is opgezet voor het detecteren van apicale effecten die worden veroorzaakt door endocriene en niet-endocriene mechanismen, en omvat diagnostische eindpunten die voor een deel specifiek zijn voor belangrijke endocriene modaliteiten. Er zij op gewezen dat er, totdat de LAGDA werd ontwikkeld, geen gevalideerde test bestond om deze functie te vervullen voor amfibieën.

5. Alvorens met de test wordt begonnen, is het van belang om over informatie te beschikken over de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof, met name voor het aanmaken van stabiele chemische oplossingen. Ook moet er een voldoende gevoelige analysemethode voorhanden zijn om de teststofconcentraties te verifiëren. De test duurt ongeveer 16 weken en er zijn in totaal 480 dieren, d.w.z. *X. laevis*-embryo's (of 640 embryo's als er een oplosmiddelcontrole wordt toegepast), nodig om te zorgen dat de test voldoende onderscheidend vermogen heeft voor het beoordelen van de eindpunten die relevant zijn voor de populatie, zoals groei, ontwikkeling en reproductieve rijping.
6. Voordat de testmethode wordt gebruikt om een mengsel te testen voor regelgevingsdoeleinden, dient te worden overwogen of zij aanvaardbare resultaten zal opleveren voor het beoogde regelgevingsdoel. Bovendien wordt in de LAGDA de vruchtbaarheid niet rechtstreeks beoordeeld, zodat de test mogelijk niet geschikt is voor gebruik in een verder gevorderd stadium dan niveau 4 van het conceptueel kader van de OESO voor het testen en beoordelen van hormoonontregelende stoffen.

WETENSCHAPPELIJKE GRONDSLAG VOOR DE TESTMETHODE

7. Onze huidige kennis van de biologie van amfibieën is voor een groot deel verkregen aan de hand van het laboratoriummodelorganisme *X. laevis*. Deze diersoort kan stelselmatig worden gekweekt in het laboratorium, de ovulatie kan worden opgewekt met behulp van humaan choriongonadotrofine (hCG) en de dieren zijn eenvoudig verkrijgbaar bij commerciële kwekers.
8. Zoals bij alle gewervelden wordt de voortplanting van amfibieën gecontroleerd door de hypothalamus-hypofyse-gonaden (HPG)-as (4). Oestrogenen en androgenen zijn mediators van dit endocriene systeem en sturen de ontwikkeling en fysiologie van seksueel dimorfe weefsels. In de levenscyclus van amfibieën zijn drie fasen te onderscheiden waarin deze as in het bijzonder actief is: 1) de differentiatie van de geslachtsklieren gedurende de larvale ontwikkeling, 2) de ontwikkeling van secundaire geslachtskenmerken en rijping van de geslachtsklieren gedurende de juveniele fase en 3) de functionele voortplanting door volwassen dieren. In elk van deze drie ontwikkelingsfasen is het endocriene systeem waarschijnlijk kwetsbaar voor hormoonontregeling door bepaalde stoffen zoals oestrogenen en androgenen, hetgeen uiteindelijk tot een vermindering van de voortplantingsgeschiktheid van de organismen kan leiden.
9. De ontwikkeling van de geslachtsklieren begint in NF-stadium 43, als de bipotentiële genitale kam zich begint te ontwikkelen. De differentiatie van de geslachtsklieren begint in NF-stadium 52, als de primordiale kiemcellen hetzij migreren naar het medullaire weefsel (mannetjes) of in het corticale gebied blijven (vrouwtjes) van de zich ontwikkelende

geslachtsklieren (3). Dat dit proces van differentiatie van de geslachtsklieren bij *Xenopus* beïnvloed kan worden door chemische stoffen, werd voor het eerst beschreven in de jaren 1950 (5) (6). Als kikkervisjes gedurende deze periode van geslachtsklierdifferentiatie worden blootgesteld aan oestradiol, leidt dit tot geslachtsverandering bij mannetjes, die als ze volwassen zijn volledig functionele vrouwtjes worden (7) (8). Functionele geslachtsverandering van vrouwtjes naar mannetjes is ook mogelijk en is beschreven voor kikkervisjes waarbij teelbalweefsel werd geïmplantéerd (9). Hoewel bij *X. tropicalis* blootstelling aan een aromataseremmer tot functionele geslachtsverandering leidt (10), is dit niet vastgesteld bij *X. laevis*. In het verleden werden de effecten van toxische stoffen op de geslachtsklierdifferentiatie altijd beoordeeld aan de hand van histologisch onderzoek van de geslachtsklieren bij de metamorfose en kon geslachtsverandering alleen worden vastgesteld door analyse van de geslachtsverhoudingen. Tot voor kort bestond er nog geen manier om rechtstreeks het genetische geslacht van *Xenopus* te bepalen. Dankzij de onlangs vastgestelde geslachtsmarkers bij *X. laevis* is het nu echter wel mogelijk het genetische geslacht te bepalen en kunnen dieren die een geslachtsverandering hebben ondergaan rechtstreeks geïdentificeerd worden (11).

10. Mannelijke juvenielen ontwikkelen zich naarmate de testosteronspiegels in het bloed stijgen, hetgeen gepaard gaat met de ontwikkeling van de secundaire geslachtskenmerken en de teelballen. Bij vrouwtjes wordt in de eierstokken oestradiol aangemaakt, wat leidt tot het verschijnen van vitellogenine (VTG) in het plasma, vitellogene oöcyten in de eierstokken en de ontwikkeling van eileiders (12). Eileiders zijn vrouwelijke secundaire geslachtskenmerken die een rol spelen bij de rijping van oöcyten tijdens de voortplanting. Wanneer de oöcyten zich door de eileider verplaatsen wordt een gelatineus omhulsel aangebracht, waarna de eieren verzameld worden in de ovisac en gereed zijn om bevrucht te worden. De ontwikkeling van de eileiders lijkt te worden gereguleerd door oestrogenen, want zowel bij *X. laevis* (13) als bij *X. tropicalis* (12) correleert deze met de spiegels van oestradiol in het bloed. Ontwikkeling van eileiders bij mannetjes is beschreven na blootstelling aan polychloorbifenylen (14) en 4-tert-octylfenol (15).

PRINCIPE VAN DE TEST

11. De testopzet van het experiment houdt in dat *X. laevis*-embryo's in NF-stadium 8-10 via de waterroute worden blootgesteld aan vier verschillende concentraties van de teststof, evenals een of meer controlegroepen tot 10 weken na de mediane tijd tot NF-stadium 62 in de controle, met één tussentijdse subbemonstering in NF-stadium 62. Hoewel het ook mogelijk zou kunnen zijn om sterk hydrofobe stoffen via het voer toe te dienen, is er tot op heden nog weinig ervaring met deze blootstellingsroute in deze test. Er zijn vier duplo's voor elke testconcentratie met acht duplo's voor elke gebruikte controle. De eindpunten die gedurende de blootstelling worden beoordeeld zijn onder meer de eindpunten die indicatief

zijn voor gegeneraliseerde toxiciteit (d.w.z. sterfte, afwijkend gedrag en groeibepalingen (lengte en gewicht)), evenals eindpunten voor het karakteriseren van specifieke endocrien toxische werkingsmechanismen op fysiologische processen waarbij oestrogenen, androgenen of schildklierhormonen een rol spelen (d.w.z. de histopathologie van de schildklier, de histopathologie van de geslachtsklieren en ei-/zaadleiders, afwijkend gedrag, vitellogenine in het plasma (optioneel) en genotypische/fenotypische geslachtsverhoudingen).

GELDIGHEIDSCRITERIA VOOR DE TEST

12. Voor de geldigheid van de test zijn de volgende criteria van toepassing:

- het gehalte aan opgeloste zuurstof moet gedurende de gehele test ≥ 40 % van de verzadigingswaarde van lucht bedragen;
- de watertemperatuur moet binnen het bereik blijven van 21 ± 1 °C en de verschillen tussen duplo's en tussen testgroepen mogen niet groter zijn dan 1,0 °C;
- de pH van de testoplossing moet tussen de 6,5 en 8,5 worden gehouden en de verschillen tussen duplo's en tussen testgroepen mogen niet groter zijn dan 0,5;
- er moet bewijs beschikbaar zijn waaruit blijkt dat de gehalten aan teststof in de oplossing binnen ± 20 % van de gemiddelde gemeten waarden zijn gehouden;
- in de controlegroepen moet de sterfte in de loop van de blootstellingsperiode ≤ 20 % zijn voor elke duplo;
- ≥ 70 % levensvatbaarheid onder de geselecteerde larven waarmee het onderzoek wordt gestart;
- de mediane tijd tot NF-stadium 62 in de controlegroepen moet ≤ 45 dagen zijn.
- het gemiddelde gewicht van de testorganismen in NF-stadium 62 en bij het einde van de test moet in de controlegroepen en de oplosmiddelcontroles (indien toegepast) respectievelijk $1,0 \pm 0,2$ g en $11,5 \pm 3$ g bereiken.

13. Hoewel geen geldigheids criterium wordt aanbevolen dat er ten minste drie behandelingsniveaus met drie ongecompromitteerde duplo's beschikbaar zijn voor analyse. Overmatige sterfte, waardoor een behandeling gecompromitteerd raakt, wordt gedefinieerd als > 4 sterfgevallen (> 20 %) in 2 of meer duplo's die niet door technisch falen kunnen worden verklaard. Er moeten ten minste drie testniveaus zonder onmiskenbare, openlijke toxiciteit beschikbaar zijn voor analyse. Mogelijke tekenen van openlijke toxiciteit zijn onder andere drijven aan de oppervlakte, liggen op de bakbodem, achteruit of onregelmatig zwemmen, niet boven water komen, niet reageren op stimuli, morfologische afwijkingen (bv. misvormingen aan de ledematen), bloeduitstortingen en oedeem van de buik.

14. Als er een afwijking van de aanvaardbaarheidscriteria voor de test wordt waargenomen, moeten de gevolgen wat betreft de betrouwbaarheid van de testresultaten in overweging worden genomen en moeten deze afwijkingen en overwegingen in het testverslag worden opgenomen.

BESCHRIJVING VAN DE METHODEN

Apparatuur

15. Standaardlaboratoriumapparatuur, met name:

- a) apparatuur voor temperatuurbeheersing (bv. verwarming of koeling (instelbaar op 21 ± 1 °C));
- b) thermometer;
- c) stereomicroscoop en ontleedinstrumenten;
- d) digitale camera met een resolutie van minimaal 4 megapixel en een microfunctie (indien nodig);
- e) precisiebalans met een nauwkeurigheid tot op 0,001 mg of 1 µg;
- f) zuurstofmeter en pH-meter;
- g) lichtsterktemeter die in luxeenheden kan meten.

Water

Herkomst en kwaliteit

16. Elk verdunningswater dat lokaal beschikbaar is (bv. bronwater of met koolstof gefilterd kraanwater) en waarin een normale groei en ontwikkeling van *X. laevis* mogelijk is, kan worden gebruikt, en er moet bewijs van normale groei in dit water beschikbaar zijn. Omdat de lokale waterkwaliteit van regio tot regio aanmerkelijk kan verschillen, moet een analyse van de waterkwaliteit worden uitgevoerd, met name als er geen historische gegevens over de bruikbaarheid van het water voor het kweken van amfibielarven beschikbaar zijn. Voor het testen begint of bijvoorbeeld ieder halfjaar als van het verdunningswater bekend is dat het een relatief constante kwaliteit heeft, moeten zware metalen (bijvoorbeeld Cu, Pb, Zn, Hg, Cd en Ni), de belangrijkste anionen en kationen (bijvoorbeeld Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), bestrijdingsmiddelen, het totaalgehalte aan organische koolstof en zwevende deeltjes worden bepaald. In aanhangsel 2 worden enkele chemische kenmerken van aanvaardbaar verdunningswater vermeld.

Jodiumgehalte in testwater

17. De schildklier kan alleen schildklierhormonen produceren die een normale metamorfose bevorderen, als er voor de larven voldoende jodium beschikbaar is uit een combinatie van

water- en voedingsbronnen. Op het ogenblik bestaan er geen empirisch gefundeerde richtsnoeren voor de minimale jodiumgehalten in voeding dan wel water die nodig zijn voor een goede ontwikkeling. De beschikbaarheid van jodium kan echter de reactiviteit van het schildklierstelsel voor op de schildklier inwerkende stoffen beïnvloeden en het is bekend dat deze beschikbaarheid de basisactiviteit van de schildklier moduleert. Bij de interpretatie van de resultaten van de histopathologie van de schildklier moet dit in aanmerking worden genomen. Op basis van eerdere ervaring is een succesvolle uitvoering van de test aangetoond met jodiumgehalten (I^-) in het verdunningswater tussen de 0,5 en 10 $\mu\text{g/l}$. Idealiter moet het minimumgehalte aan jodium in het verdunningswater gedurende de hele test 0,5 $\mu\text{g/l}$ zijn (toegevoegd als het natrium- of kaliumzout). Als synthetisch water op basis van gedeïoniseerd water wordt gebruikt, moet ten minste 0,5 $\mu\text{g/l}$ jodium worden toegevoegd. De gemeten jodiumgehalten van het testwater (d.w.z. verdunningswater) en de toevoeging van jodium of eventuele andere zouten aan het testwater moeten in het verslag worden vermeld. Behalve in het testwater kan ook het jodiumgehalte in het voer worden gemeten.

Blootstellingssysteem

18. Bij de ontwikkeling van de test werd een doorstroomverdunningssysteem gebruikt. De systeemonderdelen die in contact met water komen, moeten gemaakt zijn van glas, roestvrij staal en/of andere chemisch inerte materialen. De bakken waarin de blootstelling plaatsvindt, dienen glazen of roestvrijstalen aquaria en bakken te zijn met een bruikbaar volume tussen 4,0 en 10,0 l (minimale waterdiepte van 10 tot 15 cm). Het systeem moet geschikt zijn voor alle testconcentraties, een controle en een oplosmiddelcontrole, indien nodig, met vier duplo's per behandeling en acht in de controlegroepen. De doorstroomsnelheid naar elke bak dient constant te zijn ten behoeve van de instandhouding van de biologische omstandigheden en de blootstelling aan de teststof. Aanbevolen wordt dat de doorstroomsnelheden hoog genoeg zijn (bv. ten minste 5 verversingen per dag) om afnemen van de teststofconcentratie als gevolg van metabolisme door zowel de testorganismen als aquatische micro-organismen die in de aquaria aanwezig zijn, of abiotische afbraakroutes (hydrolyse, fotolyse) of dissipatie (vervluchtiging, sorptie) te vermijden. De testbakken moeten willekeurig worden toegewezen aan een positie in het blootstellingssysteem teneinde mogelijke locatie-effecten, zoals lichte verschillen in temperatuur, lichtsterkte e.d., te beperken. Meer informatie over de opzet van blootstellingssystemen met doorstroming is te vinden in de ASTM-normen voor het uitvoeren van acute toxiciteitsproeven op testmaterialen met vissen, macro-invertebraten en amfibieën (16).

Afgifte van de teststof: bereiding van de testoplossingen

19. Voor het maken van de testoplossingen in het blootstellingssysteem moet de stamoplossing van de teststof door middel van een geschikte pomp of ander geschikt apparaat in het blootstellingssysteem worden ingebracht. De doorstroomsnelheid van de stamoplossing moet voor aanvang van de blootstelling worden gekalibreerd volgens de analytische bevestiging van de testoplossingen en gedurende de test op gezette tijden volumetrisch worden gecontroleerd. De testoplossing in elke kamer moet met ten minste 5 volumeverversingen/dag worden verversd.
20. De methode die wordt toegepast om de teststof in het systeem te brengen, kan verschillen en is afhankelijk van de fysisch-chemische eigenschappen van de stof. Daarom is het nodig, alvorens de test te beginnen, basisinformatie over de stof in te winnen die relevant is voor het vaststellen van de testbaarheid. De volgende informatie over teststof-specifieke eigenschappen kan nuttig zijn: de structuurformule, het molecuulgewicht, de zuiverheid, de stabiliteit in water en licht, pK_a en K_{ow} , de oplosbaarheid in water (bij voorkeur in het testmedium) en de dampspanning, evenals resultaten van een test op gemakkelijke biologische afbreekbaarheid (TM C.4 (17) of TM C.29 (18)). De oplosbaarheid in water en de dampspanning kunnen worden gebruikt om de constante van de Wet van Henry te berekenen die aangeeft of verliezen vanwege verdamping van de teststof gedurende de testperiode mogelijk zijn. Uitvoering van deze test zonder de voornoemde gegevens dient zorgvuldig te worden overwogen, aangezien de onderzoeksopzet zal afhangen van de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof en de testresultaten zonder deze gegevens moeilijk te interpreteren of betekenisloos kunnen zijn. Er moet een betrouwbare, analytische methode, met een bekende en gerapporteerde nauwkeurigheid en detectiegrens, beschikbaar zijn voor de kwantitatieve bepaling van de teststof in de testoplossingen. In water oplosbare stoffen kunnen worden opgelost in aliquots met verdunningswater in een concentratie waarbij afgifte met het beoogde testgehalte in een doorstroomstelsel mogelijk is. Voor stoffen die bij kamertemperatuur vloeibaar of vast zijn en die matig oplosbaar zijn in water, is mogelijk vloeistof:vloeistof-saturatie of vloeistof:vast-saturatie (bv. glaswolkolom) nodig (19). Hoewel het ook mogelijk zou kunnen zijn om zeer hydrofobe teststoffen via het voer toe te dienen, is er nog weinig ervaring met die blootstellingsroute in deze test.
21. De testoplossingen met de gekozen concentraties worden bereid door verdunning van een stamoplossing. De stamoplossing wordt bij voorkeur bereid door eenvoudig mengen of schudden van de teststof in verdunningswater met mechanische middelen (bijvoorbeeld door te roeren en/of met ultrasone trillingen). Voor het maken van een stamoplossing van een passende concentratie kunnen verzadigingskolommen/-systemen of passieve doseringsmethoden (20) worden gebruikt. Het verdient de voorkeur om een co-oplosmiddelvrij testsysteem te gebruiken; maar verschillende teststoffen hebben verschillende fysisch-chemische eigenschappen die waarschijnlijk een verschillende

aanpak bij de bereiding van het water voor de chemische blootstelling vereisen. Alles moet in het werk worden gesteld om oplosmiddelen en draagvloeistoffen te vermijden, omdat: 1) bepaalde oplosmiddelen zelf toxiciteit en/of ongewenste of onverwachte endocrinologische reacties kunnen veroorzaken, 2) het testen van chemicaliën boven hun oplosbaarheid in water (zoals vaak kan gebeuren door het gebruik van oplosmiddelen) kan leiden tot een onnauwkeurige bepaling van de effectieve concentraties, 3) het gebruik van oplosmiddelen in tests op langere termijn kan leiden tot de vorming van een aanzienlijke "biofilm" als gevolg van microbiële activiteit die van invloed kan zijn op de omgevingsomstandigheden en op het vermogen om de blootstellingsconcentraties te handhaven, en 4) bij gebrek aan historische gegevens die aantonen dat het oplosmiddel de uitkomst van het onderzoek niet beïnvloedt, het gebruik van oplosmiddelen een oplosmiddelcontrole noodzakelijk maakt, wat aanmerkelijke gevolgen heeft op het vlak van dierenwelzijn, aangezien er extra dieren nodig zijn voor het uitvoeren van de test. Voor moeilijk te testen stoffen kan in laatste instantie een oplosmiddel de beste keuze zijn; raadpleeg de OESO-leidraad voor het testen op aquatische toxiciteit bij moeilijke stoffen en mengsels (21) om de beste methode te bepalen. De keuze van het juiste oplosmiddel hangt af van de chemische eigenschappen van de teststof. De keuze van het oplosmiddel wordt bepaald door de chemische eigenschappen van de teststof en de beschikbaarheid van historische controlegegevens over het oplosmiddel. Indien historische gegevens ontbreken, moet de geschiktheid van een oplosmiddel worden vastgesteld alvorens het definitieve onderzoek uit te voeren. Als het gebruik van een oplosmiddel onvermijdelijk is en er microbiële activiteit (biofilm) optreedt, wordt aanbevolen gedurende de hele test de biofilmvorming in elke bak (ten minste wekelijks) te registreren/rapporteren. Idealiter moet de oplosmiddelconcentratie in de oplosmiddelcontrole en alle testbehandelingen constant worden gehouden. Als de concentratie oplosmiddel niet constant wordt gehouden, moet in de oplosmiddelcontrole de hoogste concentratie oplosmiddel van de testbehandeling worden gebruikt. Bij gebruik van een oplosmiddel als draagvloeistof mogen de oplosmiddelconcentraties niet hoger zijn dan 100 µl/l or 100 mg/l (21), en wordt aanbevolen om de oplosmiddelconcentratie zo laag mogelijk te houden (bv. ≤ 20 µl/l) om potentiële effecten van het oplosmiddel op de gemeten eindpunten te vermijden (22).

Proefdieren

Testsoort

22. De testsoort is *X. laevis* omdat: 1) deze stelselmatig wordt gekweekt in laboratoria over de hele wereld, 2) deze gemakkelijk te verkrijgen is via commerciële leveranciers en 3) het genetische geslacht ervan bepaald kan worden.

Verzorging van volwassen dieren en kweek

23. De juiste verzorgings- en kweekmethoden voor *X. laevis* staan beschreven in een standaardrichtsnoer (23). De huisvesting en verzorging van *X. laevis* worden ook beschreven door Read (24). Om voortplanting op te wekken, worden drie tot vijf paartjes volwassen vrouwtjes en mannetjes intraperitoneaal geïnjecteerd met humaan choriongonadotrofine (hCG). Vrouwelijke en mannelijke specimina worden geïnjecteerd met respectievelijk ongeveer 800-1 000 IU en 500-800 IU hCG in 0,6-0,9 % zoutoplossing (of oplossing van Ringer voor kikkers, een isotone zoutoplossing voor gebruik met amfibieën; www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html). De injectievolumes moeten ongeveer 10 µl/g lichaamsgewicht (~1 000 µl) bedragen. Daarna worden de paartjes waarbij de voortplanting is opgewekt, ongestoord en onder statische omstandigheden in grote bakken gehouden om de paargreep (amplexus) te bevorderen. De vloer van elke kweekbak moet zijn voorzien van een dubbele bodem van roestvrijstaal gaas (bv. openingen van 1,25 cm) waardoor de eieren op de bodem van de bak kunnen vallen. Kikkers die in de late namiddag met hCG zijn geïnjecteerd, zullen gewoonlijk het merendeel van hun eieren halverwege de ochtend van de volgende dag gelegd hebben. Nadat voldoende eieren zijn gelegd en bevrucht, moeten de volwassen dieren uit de kweekbakken worden verwijderd. De eieren worden verzameld en de gelatineuze omhulsels worden verwijderd door behandeling met L-cysteïne (23). Hiertoe wordt een 2 % L-cysteïneoplossing bereid en de pH wordt met behulp van 1 M NaOH op 8,1 gesteld. Deze oplossing wordt bij 21 °C toegevoegd aan een erlenmeyer van 500 ml met de eieren van één legsel. Na één of twee minuten zachtjes zwenken wordt 6-8 maal grondig gespoeld met kweekwater van 21 °C. Vervolgens worden de eieren overgebracht in een kristalliseerschaal en wordt vastgesteld dat ze > 70 % levensvatbaar zijn met minimale afwijkingen in embryo's die celdeling vertonen.

TESTOPZET

Testconcentraties

24. Aanbevolen wordt om ten minste vier teststofconcentraties en passende controles te gebruiken (met zo nodig oplosmiddelcontroles). Over het algemeen wordt aanbevolen de afstand tussen de concentraties (intervalsfactor) niet groter te nemen dan 3,2.
25. Voor de doeleinden van deze test moet bij het bepalen van de hoogste testconcentratie zoveel mogelijk gebruik worden gemaakt van de resultaten van bestaande amfibieonderzoeken, teneinde concentraties die openlijk toxisch zijn te vermijden. Zo zouden informatie uit kwantitatieve structuur-activiteitsrelaties, read-across en gegevens van bestaande amfibieonderzoeken zoals de amfibische metamorfosetest, testmethode C.38 (25) en de Frog Embryo Teratogenesis Assay – *Xenopus* (23) en/of tests bij vissen zoals de testmethoden C.48, C.41 en C.49 (26) (27) (28) aan de bepaling van deze concentratie kunnen bijdragen. Alvorens de LAGDA uit te voeren moet er een bereikbepalingstest

worden uitgevoerd. Aanbevolen wordt om de blootstelling om het bereik te bepalen binnen 24 uur na de bevruchting te starten en gedurende 7-14 dagen (of meer, indien nodig) voort te zetten, en om de testconcentraties zodanig te kiezen dat de intervallen tussen de testconcentraties niet groter zijn dan een factor 10. De hoogste testconcentratie in de LAGDA moet worden bepaald op basis van de resultaten van de bereikbepalingstest. Er zij op gewezen dat als er een oplosmiddel wordt gebruikt, de geschiktheid van het oplosmiddel (d.w.z. of het mogelijk een effect heeft op de uitkomst van het onderzoek) zou kunnen worden vastgesteld tijdens de bereikbepalingstest.

Duplo's binnen behandelingsgroepen en controles

26. Er moeten ten minste vier duplobakken per testconcentratie en ten minste acht duplo's voor de controles (en de oplosmiddelcontrole, indien nodig) worden gebruikt (d.w.z. het aantal duplo's in de controle en de eventuele oplosmiddelcontrole moet tweemaal zo groot zijn als het aantal duplo's van elke behandelingsgroep, dit om voldoende statistisch onderscheidingsvermogen te waarborgen). Elke duplo mag niet meer dan 20 dieren bevatten. Het minimumaantal gebruikte dieren zou op 15 komen (5 voor de subbemonstering in NF-stadium 62 en 10 juvenielen). Er worden evenwel extra dieren aan elke duplo toegevoegd om in geval van eventuele sterfte niet onder de kritische grens van 15 uit te komen.

PROCEDURE

Overzicht van de test

27. De test wordt begonnen met vroege embryo's (NF-stadium 8-10) en loopt door tot in de juveniele ontwikkeling. De dieren worden dagelijks gecontroleerd op sterfte en tekenen van afwijkend gedrag. Voor de subbemonstering in NF-stadium 62 wordt een steekproef van larven (tot 5 dieren per duplo) genomen en op verscheidene eindpunten onderzocht (tabel 1). Wanneer alle dieren NF-stadium 66, d.w.z. de voltooiing van de metamorfose, hebben bereikt (of na 70 dagen vanaf het begin van de test, indien dat eerder is), wordt op aselechte wijze (maar zonder subbemonstering) een uitdunning uitgevoerd om het aantal dieren te verkleinen (10 per bak) (zie paragraaf 43), waarna voor de overgebleven dieren de blootstelling wordt voortgezet tot 10 weken na de mediane tijd tot NF-stadium 62 in de controle. Bij het einde van de test (bemonstering van juvenielen) worden aanvullende metingen verricht (tabel 1).

Blootstellingsomstandigheden

28. In aanhangsel 3 is een volledig overzicht van de testparameters te vinden. Gedurende de blootstellingsperiode moeten dagelijks de opgeloste zuurstof, temperatuur en pH van de testoplossingen worden gemeten. De geleidbaarheid, alkaliniteit en hardheid worden eens

per maand gemeten. Voor de watertemperatuur van de testoplossingen mogen de verschillen tussen duplo's en tussen testgroepen (binnen één dag) niet groter zijn dan 1,0 °C. Voor de pH van de testoplossingen mag het verschil tussen de verschillende duplo-/testbakken niet groter zijn dan 0,5.

29. Elke dag kunnen met een hevel niet-opgegeven voedsel en afval uit de blootstellingsbakken worden verwijderd, waarbij kruisverontreiniging tussen de bakken zorgvuldig vermeden moet worden. Er moet zorgvuldig worden gestreefd naar minimalisering van stress en trauma bij de dieren, met name tijdens het verplaatsen, het schoonmaken van aquaria en het manipuleren van de dieren. Stressvolle omstandigheden/activiteiten, zoals hard en/of onophoudelijk geluid, tikken op aquaria en trillingen in de bak dienen te worden vermeden.

Duur van de blootstelling aan de teststof

30. De blootstelling wordt begonnen met vroege embryo's (NF-stadium 8-10) en wordt voortgezet tot tien weken na de mediane tijd tot NF-stadium 62 (≤ 45 dagen na het begin van de test) in de controlegroep. Doorgaans duurt de LAGDA 16 weken (maximaal 17 weken).

Start van de test

31. Van de ouderdieren die voor de start van de test worden gebruikt, moet eerder zijn gebleken dat ze nageslacht voortbrengen waarvan het genetische geslacht kan worden bepaald (aanhangel 5). Nadat de volwassenen hebben gepaaid worden de embryo's verzameld, met cysteïne behandeld om het gelatineuze omhulsel te verwijderen en gescreend op levensvatbaarheid (23). De cysteïnebehandeling zorgt ervoor dat de embryo's tijdens de screening gehanteerd kunnen worden zonder dat ze aan oppervlakken kleven. De screening vindt plaats onder een stereomicroscoop met behulp van een druppelpipet van passend formaat ter verwijdering van niet-levensvatbare embryo's. Bij voorkeur wordt voor de test een enkel legsel gebruikt met meer dan 70 % levensvatbaarheid. De embryo's in NF-stadium 8-10 worden willekeurig verdeeld over testbakken met een passend volume verdunningswater, totdat elke bak 20 embryo's bevat. De embryo's moeten tijdens dit overbrengen omzichtig worden behandeld om de stress van de verplaatsing tot een minimum te beperken en verwondingen te vermijden. 96 uur na de bevruchting moeten de kikkervisjes de waterkolom opgeklommen zijn en begonnen zijn zich aan de wanden van de bak vast te houden.

Voerschema

32. Het voer en de voederfrequentie veranderen in de loop van de levensstadia van *X. laevis* en vormen een zeer belangrijk aspect van het LAGDA-protocol. Overvoeren in de larvale fase leidt doorgaans tot verhoogde incidenties en ernst van scoliose (aanhangel 8) en moet

worden vermeden. Anderzijds leidt onvoldoende voer in de larvale fase tot een sterk uiteenlopend ontwikkelingstempo in de controlegroepen, wat ten koste kan gaan van het statistisch onderscheidingsvermogen of de testresultaten kan verstoren. In aanhangsel 4 worden een aanbevolen dieet en aanbevolen voerschema's voor het larvale en het juveniele stadium van *X. laevis* onder doorstroomomstandigheden beschreven, maar alternatieven zijn geoorloofd, mits de testorganismen naar behoren groeien en zich ontwikkelen. Er zij op gewezen dat als er endocrien-specifieke eindpunten worden gemeten, het voer vrij moet zijn van stoffen met endocriene activiteit zoals sojameel.

Het voeren van de larven

33. Het aanbevolen dieet voor de larven bestaat uit een mengsel van startvoer voor forellen, *Spirulina*-algetabletten en goudvisvlokken (bv. TetraFin[®]-vlokken, Tetra, Duitsland) in kweekwater (of verdunningswater). Dit mengsel wordt door de week driemaal per dag toegediend en in het weekend eenmaal per dag. Vanaf dag 8 na de bevruchting krijgen de kikkervisjes ook levende pekelkreeftjes, *Artemia* spp., 24 uur oude nauplii, tweemaal daags door de week en eenmaal daags in het weekend. Het voerschema voor de larven, dat voor elke testbak gelijk moet zijn, moet toereikend zijn voor goede groei en ontwikkeling van proefdieren met het oog op de reproduceerbaarheid en overdraagbaarheid van de testresultaten: 1) de mediane tijd tot NF-stadium 62 in de controles moet ≤ 45 dagen zijn en 2) een gemiddeld gewicht van $1,0 \pm 0,2$ g in NF-stadium 62 in de controles wordt aanbevolen.

Het voeren van de juvenielen

34. Zodra de metamorfose is voltooid bestaat het dieet uit hoogwaardig zinkend kikkervoer, bv. Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, VS) (aanshangsel 4). Voor kleine kikkertjes (vroege juvenielen) worden de korrels kort gemalen in een koffiemolen of blender of met een stamper gebroken in een vijzel om ze kleiner te maken. Als de juvenielen groot genoeg zijn om hele korrels te eten, is het malen of breken niet meer nodig. De dieren moeten eenmaal per dag worden gevoerd. Het voerschema moet toereikend zijn voor goede groei en ontwikkeling van de dieren: aanbevolen wordt dat het gemiddelde gewicht van de controlejuvenielen bij het einde van de test $11,5 \pm 3$ g bedraagt.

Analytische scheikunde

35. Alvorens de test te starten moeten de stabiliteit van de teststof (bv. oplosbaarheid, afbreekbaarheid en vluchtigheid) en alle benodigde analytische methoden worden vastgesteld, bv. met behulp van bestaande informatie en kennis. Bij toediening via het verdunningswater wordt aanbevolen om voor aanvang van de test de testoplossingen van elke duplobak-concentratie te analyseren om de systeemprestaties te verifiëren. Gedurende de blootstellingsperiode worden op geschikte tijdstippen de concentraties van de teststof

bepaald, bij voorkeur elke week voor ten minste één duplo in elke behandelingsgroep, waarbij elke week geroteerd wordt tussen de duplo's van dezelfde behandelingsgroep. Het is wenselijk de resultaten te baseren op gemeten concentraties. Indien de concentratie van de teststof in de oplossing gedurende de gehele test goed binnen een marge van $\pm 20\%$ van de nominale concentratie is gehouden, mogen de resultaten echter worden gebaseerd op nominale of gemeten waarden. De variatiecoëfficiënt (CV) van de gemeten testconcentraties gedurende de hele testperiode binnen een behandeling moet voor elke concentratie op 20% of minder worden gehouden. Wanneer de gemeten concentraties niet binnen een marge van $80\text{--}120\%$ van de nominale concentratie blijven (bijvoorbeeld bij het testen van biologisch sterk afbreekbare of adsorptieve stoffen), moeten de uitkomstconcentraties worden bepaald en uitgedrukt in verhouding tot het rekenkundige gemiddelde van de concentraties voor doorstroomtests.

36. In de loop van de hele blootstellingsduur moeten de stroomsnelheden van het verdunningswater en de stamoplossing op geschikte tijdstippen (bv. driemaal per week) worden gecontroleerd. Indien stoffen bij sommige of alle nominale concentraties niet gedetecteerd kunnen worden (bv. als gevolg van snelle afbraak of adsorptie in de testbakken, of door aanmerkelijke chemische accumulatie in de lichamen van de blootgestelde dieren), wordt aanbevolen de verversingssnelheid van de testoplossing in elke kamer aan te passen om de testconcentraties zo constant mogelijk te houden.

Waarnemingen en eindpuntmetingen

37. De eindpunten die gedurende de blootstelling worden beoordeeld, zijn de eindpunten die indicatief zijn voor toxiciteit, waaronder sterfte, afwijkend gedrag zoals klinische tekenen van ziekte en/of algemene toxiciteit, en groeibepalingen (lengte en gewicht), evenals pathologische eindpunten die toe te schrijven kunnen zijn aan zowel algemene toxiciteit als endocriene werkingsmechanismen waarbij oestrogenen, androgenen of schildklierhormonen een rol spelen. Daarnaast is het een optie om bij het einde van de test de VTG-concentratie in het plasma te meten. Meting van VTG kan van pas komen voor het begrijpen van de onderzoeksresultaten voor wat betreft de endocriene mechanismen voor stoffen waarvan wordt vermoed dat ze hormoonontregelende stoffen zijn. In tabel 1 wordt een overzicht gegeven van de eindpunten en meettijdstippen.

Tabel 1: Overzicht van eindpunten van de LAGDA

Eindpunten*	Dagelijks	Tussentijdse bemonstering (bemonstering van larven)	Eind van de test (bemonstering van juvenielen)
Sterfte en afwijkingen	X		

Tijd tot NF-stadium 62		X	
Histo(patho)logie (schildklier)		X	
Morfometrie (groei in gewicht en lengte)		X	X
Lever-somatische index (LSI)			X
Genetische/fenotypische geslachtsverhoudingen			X
Histopathologie (geslachtsklieren, ei-/zaadleiders, nieren en lever)			X
Vitellogenine (VTG) (optioneel)			X

* Alle eindpunten worden statistisch geanalyseerd.

Sterfte en dagelijkse waarnemingen

38. Dagelijks moeten alle testbakken worden gecontroleerd op dode dieren en moet het aantal sterfgevallen per bak worden genoteerd. Dode dieren dienen na waarneming uit de testbak te worden verwijderd. Het ontwikkelingsstadium van de dode dieren moet worden ingedeeld in een van de volgende stadia: pre-NF-stadium 58 (nog geen voorpoten aanwezig), NF-stadium 58-NF-stadium 62, NF-stadium 63-NF-stadium 66 (tussen NF-stadium 62 en volledige resorptie van de staart), of post-NF-stadium 66 (post-larvaal). Sterftecijfers van meer dan 20 % kunnen duiden op ongewenste testomstandigheden of openlijk toxische effecten van de teststof. De dieren zijn doorgaans het gevoeligst voor niet door chemische stoffen veroorzaakte sterfte in de eerste dagen van de ontwikkeling nadat de eieren gelegd zijn en gedurende de climax van de metamorfose. Een dergelijke sterfte kan duidelijk naar voren komen uit de gegevens over de controlegroepen.
39. Daarnaast moeten eventuele waarnemingen van afwijkend gedrag, grove zichtbare misvormingen (bv. scoliose) of verwondingen geregistreerd worden. De waarnemingen van scoliose moeten worden geteld (incidentie) en van een ernstscore worden voorzien (bv. niet zichtbaar (not remarkable) – NR, minimaal – 1, matig – 2, ernstig – 3; zie aanhangsel 8). Er moet naar gestreefd worden dat de prevalentie van matige en ernstige scoliose in de loop van het onderzoek beperkt blijft (bv. minder dan 10 % in de controles), hoewel een hogere prevalentie van afwijkingen in de controles geen reden hoeft te zijn om de test af te breken. Normaal gedrag voor larven wordt gekenmerkt door met de staart opgericht boven hun kop zweven in de waterkolom, regelmatig met de staartvin slaan, geregeld aan de oppervlakte komen, een werkend kieuwdeksel hebben en reageren op stimuli. Abnormale gedragingen zijn bijvoorbeeld drijven aan de oppervlakte, liggen op de bakbodem, achteruit of onregelmatig zwemmen, niet boven water komen en niet reageren op stimuli. Voor dieren die de metamorfose hebben ondergaan, moeten naast voornoemde afwijkende gedragingen ook grove verschillen in voedselconsumptie tussen de

behandelingen worden geregistreerd. Bij grove misvormingen en verwondingen kan het gaan om morfologische afwijkingen (bv. misvormde ledematen), bloeduitstortingen, oedeem van de buik, bacteriële of schimmelinfecties enz. Het optreden van verwondingen aan de kop van juvenielen, vlak achter de neusgaten, kan duiden op een te lage vochtigheidsgraad. Deze vaststellingen zijn kwalitatief, ze moeten opgevat worden als vergelijkbaar met klinische tekenen van ziekte/stress en moeten worden vergeleken met die bij controledieren. Als de verschijnselen in testbakken vaker voorkomen dan in de controlebakken, moeten ze worden beschouwd als bewijs van openlijke toxiciteit.

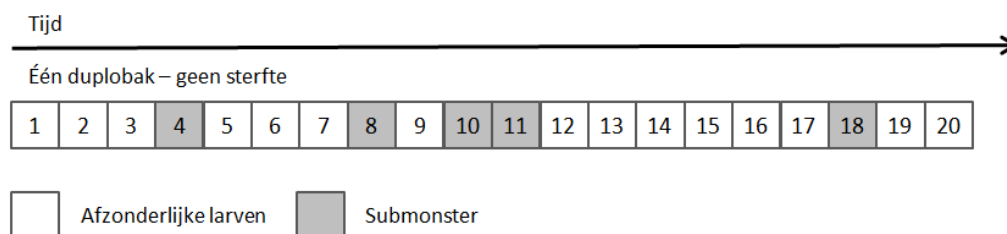
Subbemonstering van larven

Algemene beschrijving van de subbemonstering van larven:

40. De kikkervisjes die NF-stadium 62 hebben bereikt, moeten uit de bakken worden verwijderd en hetzij in de steekproef worden opgenomen hetzij worden verplaatst naar het vervolg van de blootstelling in een nieuwe bak, of anders in dezelfde bak fysiek van de overgebleven kikkervisjes worden gescheiden met een tussenschot. De kikkervisjes worden dagelijks gecontroleerd en voor elk kikkervisje wordt de onderzoeksdag geregistreerd waarop het NF-stadium 62 bereikt. Het bepalende kenmerk voor deze beoordeling is de vorm van de kop. Zodra de kop in omvang is afgenomen zodat deze er ongeveer even breed uit ziet als de romp van het kikkervisje en de voorpoten op dezelfde hoogte zitten als het midden van het hart, wordt het kikkervisje geteld als kikkervisje dat NF-stadium 62 heeft bereikt.
41. Het doel hiervan is om een steekproef van in totaal vijf kikkervisjes in NF-stadium 62 per duplobak te nemen. Deze steekproef dient geheel aselekt te worden uitgevoerd, maar moet vooraf worden bepaald. In **figuur 1** wordt een hypothetisch voorbeeld van een duplobak weergegeven. Als er in een bepaalde bak 20 overlevende kikkervisjes zijn wanneer het eerste kikkervisje NF-stadium 62 bereikt, dan worden er vijf willekeurige nummers gekozen tussen 1 en 20. Kikkervisje 1 is het eerste kikkervisje dat NF-stadium 62 bereikt en kikkervisje 20 is het laatste kikkervisje in een bak dat NF-stadium 62 bereikt. Evenzo worden er als een bak 18 overlevende larven bevat, vijf willekeurige nummers gekozen tussen 1 en 18. Dit moet gebeuren voor elke duplobak zodra het eerste kikkervisje in de test NF-stadium 62 bereikt. Als er gevallen van sterfte zijn tijdens de bemonstering voor NF-stadium 62, moeten de resterende steekproeven opnieuw gerandomiseerd worden op basis van het aantal overgebleven larven < NF-stadium 62 en hoeveel steekproeven er nog nodig zijn om het aantal van vijf steekproeven per duplo te bereiken. Op de dag dat een kikkervisje NF-stadium 62 bereikt wordt het vooraf opgestelde bemonsteringsschema geraadpleegd om te bepalen of dat kikkervisje in de steekproef wordt opgenomen of fysiek gescheiden wordt van de resterende kikkervisjes voor verdere blootstelling. In het voorbeeld in figuur 1 wordt het eerste kikkervisje dat NF-stadium 62 bereikt (d.w.z.

vakje 1), fysiek gescheiden van de andere larven, ondergaat het verdere blootstelling en wordt de onderzoeksdag waarop het NF-stadium 62 bereikte, geregistreerd. De kikkervisjes 2 en 3 worden op dezelfde manier behandeld als kikkervisje 1 en dan wordt kikkervisje 4 in de steekproef opgenomen voor groei en schildklierhistologie (volgens dit voorbeeld). Deze procedure gaat door tot het 20e kikkervisje hetzij bij de andere post-NF-stadium 62-kikkervisjes wordt gevoegd, hetzij in de steekproef wordt opgenomen. De gebruikte willekeurige selectieprocedure moet waarborgen dat elk organisme in de test een gelijke kans heeft om te worden geselecteerd. Hiervoor kan elke gerandomiseerde methode worden gebruikt, maar het is ook noodzakelijk dat elk kikkervisje op enig moment in de loop van de NF-stadium 62-subbemonsteringsperiode, in een net wordt gevangen.

Figuur 1: Hypothetisch voorbeeld van een schema voor de NF-stadium 62-subbemonstering voor één duplobak.



42. De eindpunten die voor de subbemonstering van larven worden verkregen, zijn: 1) tijd tot NF-stadium 62 (d.w.z. aantal dagen tussen bevruchting en NF-stadium 62), 2) uitwendige afwijkingen, 3) morfometrie (bv. gewicht en lengte) en 4) schildklierhistologie.

Op humane wijze doden van de kikkervisjes

43. De kikkervisjes in de steekproef voor de NF-stadium 62-subbemonstering (5 kikkervisjes per duplo) moeten worden geëuthanaseerd door onderdompeling gedurende 30 minuten in passende hoeveelheden (bv. 500 ml) anesthesische oplossing (bv. 0,3 % oplossing van MS-222, tricaïnemethaansulfonaat, CAS.886-86-2). De MS-222-oplossing moet worden gebufferd met natriumbicarbonaat op een pH van ongeveer 7,0, omdat ongebufferde MS-222-oplossing zuur is en irriterend voor kikkerhuid, wat leidt tot slechte opname en nodeloze extra stress voor de dieren.
44. Een kikkervisje wordt met behulp van een mesh schepnetje uit de testkamer verwijderd en naar de euthanasieoplossing overgebracht (ondergedompeld). Het dier wordt naar behoren geëuthanaseerd en is gereed voor obductie wanneer het niet meer reageert op externe stimuli, zoals knijpen in de achterpoot met een tangetje.

Morfometrie (gewicht en lengte)

45. Bij elk kikkervisje moeten het natte gewicht (afgerond op mg) en de lengte van snuit tot anus (snout to vent, SVL) (afgerond op 0,1 mm) worden gemeten zodra het door het anestheticum niet meer op stimuli reageert (figuur 2a). Er kan gebruikgemaakt worden van beeldanalysesoftware om de SVL te meten op basis van een foto. Voordat de kikkervisjes worden gewogen, moeten ze worden drooggedept om aanhangend water te verwijderen. Na het meten van de lichaamsgrootte (gewicht en SVL) moeten eventuele grove morfologische afwijkingen en/of klinische tekenen van toxiciteit zoals scoliose (zie aanhangsel 8), petechieën en bloeditstoringen worden geregistreerd en genoteerd. Digitale documentatie wordt aanbevolen. Petechieën zijn kleine rode of paarse bloeditstortinkjes in de huidhaarvaten.

Verzameling en fixatie van weefsels

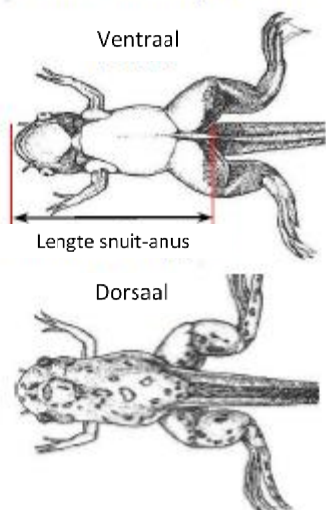
46. Van de larven in de steekproef van de subbemonstering worden de schildklieren histologisch beoordeeld. Het onderste deel van de romp achter de voorpoten wordt verwijderd en afgevoerd. Het ingekorte karkas wordt gefixeerd met Davidson-fixeermiddel. Het volume aan fixeermiddel in de recipiënt moet ten minste 10 maal het geschatte volume van de weefsels zijn. Het fixeermiddel moet voldoende worden geschud of gezwenkt om de te bestuderen weefsels voldoende te fixeren. Alle weefsels blijven ten minste 48 uur maar niet langer dan 96 uur in het Davidson-fixeermiddel, waarna ze worden afgespoeld in gedeïoniseerd water en bewaard in 10 % neutraal gebufferde formaline (1) (29).

Schildklierhistologie

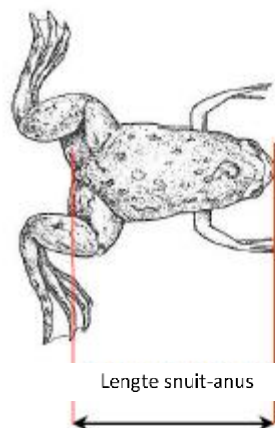
47. Van elke larve in de steekproef van de subbemonstering (gefixeerde weefsels) worden de schildklieren histologisch beoordeeld, d.w.z. diagnose en ernstscore (29) (30).

Figuur 2: IJkpunten voor het meten van de lengte van snuit tot anus (SVL) voor de LAGDA in NF-stadium 62 (a) en juveniele kikkers (b). De bepalende kenmerken van NF-stadium 62 (a): de kop is even breed als de romp, de lengte van de reukzenuw is kleiner dan de doorsnede van de bulbus olfactorius (op de rug gezien) en de voorpoten zitten op dezelfde hoogte als het hart (op de buik gezien). Afbeeldingen gebaseerd op Nieuwkoop en Faber (1994).

a. Larvale subbemonstering (NF-stadium 62)



b. Juvenile bemonstering



Einde van de larvale blootstelling

48. Gegeven het aantal kikkervisjes waarmee begonnen wordt, zal er naar verwachting een klein percentage kikkervisjes zijn dat zich niet normaal ontwikkelt en niet binnen een redelijke tijdsspanne de metamorfose voltooit (NF-stadium 66). Na 70 dagen moet de larvale blootstelling niet verder worden voortgezet. Kikkervisjes die aan het einde van die periode nog over zijn, worden geëuthanaseerd (zie par. 43), hun natte gewicht en SVL worden gemeten, hun ontwikkelingsstadium volgens Nieuwkoop en Faber (1994) wordt bepaald en eventuele ontwikkelingsafwijkingen worden genoteerd.

Uitdunning na NF-stadium 66

49. Vanaf NF-stadium 66 (volledige resorptie van de staart) wordt met tien dieren per bak doorgegaan tot het eind van de blootstelling. Zodra alle dieren NF-stadium 66 hebben bereikt of na 70 dagen (indien dat eerder is) moet daarom een uitdunning worden uitgevoerd. De post-NF-stadium 66-dieren waarbij de blootstelling wordt voortgezet moeten willekeurig worden geselecteerd.
50. De dieren die niet worden geselecteerd voor verdere blootstelling worden geëuthanaseerd (zie par. 43). Bij elk dier worden het ontwikkelingsstadium, nat gewicht en SVL (figuur 2b) gemeten en wordt een macroscopische obductie verricht. Het fenotypische geslacht (op basis van de morfologie van de geslachtsklieren) wordt genoteerd als vrouwelijk, mannelijk of onbepaald.

Bemonstering van juvenielen

Algemene beschrijving van de bemonstering van juvenielen

51. De overgebleven dieren worden verder blootgesteld tot 10 weken na de mediane tijd tot NF-stadium 62 in de controle met verdunningswater (en/of de oplosmiddelcontrole indien van toepassing). Aan het einde van de blootstellingsperiode worden de overgebleven dieren (maximaal 10 kikkers per duplo) geëuthanaseerd en worden de verschillende eindpunten gemeten/beoordeeld en geregistreerd: 1) morfometrie (gewicht en lengte), 2) fenotypische/genotypische geslachtsverhouding, 3) levergewicht (Lever-Somatische Index), 4) histopathologie (geslachtsklieren, ei-/zaadleiders, lever en nieren) en optioneel 5) VTG in plasma.

Op humane wijze doden van de kikkers

52. De steekproeven van juvenielen (post-metamorfotische kikkers) worden geëuthanaseerd door middel van een intraperitoneale injectie van een anestheticum, bv. 10 % MMS-222 in een naar behoren fosfaatgebufferde oplossing. De kikkers kunnen bemonsterd worden wanneer ze niet meer reageren op stimuli (doorgaans zo'n 2 min na injectie, indien 10 % MS-222 wordt gebruikt in een dosering van 0,01 ml per g lichaamsgewicht). Hoewel de juveniele kikkers ook ondergedompeld zouden kunnen worden in een hogere concentratie anestheticum (MS-222), leert de ervaring dat het met die methode langer duurt om ze te anestheseren en dat de duur de bemonstering zou kunnen belemmeren. Injectie zorgt voor efficiënte, snelle euthanasie voorafgaand aan bemonstering. De bemonstering mag pas worden gestart als bevestigd is dat de kikkers niet meer op stimuli reageren om er zeker van te zijn dat de dieren echt dood zijn. Als de kikkers tekenen van aanzienlijk lijden vertonen (zeer ernstige gevallen waarbij de dood betrouwbaar kan worden voorspeld) en als stervende beschouwd kunnen worden, moeten ze worden verdoofd en gedood en voor de gegevensanalyse worden meegerekend onder sterfte. Wanneer een kikker wordt geëuthanaseerd vanwege ziekelijkheid moet dit worden genoteerd en in het onderzoeksverslag worden opgenomen. Afhankelijk van het moment in het onderzoek waarop de kikker gedood werd, kan hij worden bewaard zodat een histopathologische analyse kan worden uitgevoerd (waarbij de kikker wordt gefixeerd voor eventuele histopathologie).

Morfometrie (gewicht en lengte)

53. De metingen van nat gewicht en SVL (figuur 2b) zijn gelijk aan die beschreven voor de bemonstering van larven.

VTG in plasma

54. VTG is een breed aanvaarde biomarker die het gevolg is van blootstelling aan stoffen met oestrogene werking. Voor de LAGDA is het een optie om VTG in plasma te meten in de juvenielenmonsters (die kan vooral relevant zijn als vermoed wordt dat de teststof een oestrogene werking heeft).

55. De achterpoten van de geëuthanaseerde juveniel worden afgesneden en het bloed wordt verzameld met een gehepariniseerd capillair buisje (hoewel ook alternatieve methoden voor bloedafname zoals hartpunctie mogelijk toepasbaar zijn). Het wordt overgebracht in een microcentrifugebuisje (bv. 1,5 ml volume) en gecentrifugeerd om plasma te verkrijgen. De plasmamonsters worden bewaard bij of onder -70°C tot de bepaling van VTG. De VTG-concentratie in het plasma kan worden gemeten door middel van een Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-(ELISA-)methode (aanhangel 6) of een alternatieve methode zoals de massaspectrometer (31). Soortspecifieke antilichamen verdienen de voorkeur vanwege hogere gevoeligheid.

Bepaling van het genetische geslacht

56. Het genetische geslacht van elke juveniele kikker wordt bepaald op basis van de door Yoshimoto *et al.* (11) ontwikkelde markers. Om het genetische geslacht te bepalen wordt een deel van een (of de gehele) achterpoot (of enig ander weefsel) die is verwijderd bij de dissectie, bewaard in een microcentrifugebuisje (weefselmonsters van kikkers kunnen van elk weefsel worden verkregen). Het weefsel kan worden bewaard bij of onder -20°C tot isolatie van het DNA. De isolatie van DNA uit weefsels kan worden uitgevoerd met in de handel verkrijgbare kits en de analyse op aan- of afwezigheid van de marker wordt verricht met een polymerasekettingreactie- (PCR-)methode (aanhangel 5). Over het algemeen vallen het histologische geslacht en het genotype bij controledieren op het tijdstip van de bemonstering van juvenielen in controlegroepen voor meer dan 95 % samen.

Verzameling van weefsel en fixatie voor histopathologie

57. Bij de eindbemonstering worden de geslachtsklieren, ei-/zaadleiders, nieren en levers verzameld voor histologische analyse. De buikholte wordt geopend en de lever wordt uitgesneden en gewogen. Vervolgens worden de spijsverteringsorganen (maag, darmen enz.) zorgvuldig uit de onderbuik verwijderd om de geslachtsklieren, nieren en ei-/zaadleiders zichtbaar te maken. Alle grove morfologische afwijkingen in de geslachtsklieren moeten worden genoteerd. Tot slot moeten de achterpoten worden verwijderd als deze nog niet eerder verwijderd zijn voor bloedafname. De verzamelde levers en het karkas met de geslachtsklieren *in situ* moeten onmiddellijk in Davidson-fixeermiddel worden geplaatst. Het volume aan fixeermiddel in de recipiënt moet ten minste 10 maal het geschatte volume van de weefsels zijn. Alle weefsels blijven ten minste 48 uur maar niet langer dan 96 uur in het Davidson-fixeermiddel, waarna ze worden afgespoeld in gedeïoniseerd water en bewaard in 10 % neutraal gebufferde formaline (1) (29).

Histopathologie

58. Elke steekproef van juvenielen wordt histologisch beoordeeld op pathologie in de geslachtsklieren, ei-/zaadleiders, nieren en het leverweefsel, d.w.z. diagnose en ernstscore

(32). Uit deze beoordeling wordt eveneens het geslachtsklierfenotype (bv. eierstokken, teelballen, intersekse) afgeleid. Samen met de afzonderlijke metingen van het genetisch geslacht kunnen deze waarnemingen worden gebruikt om de fenotypische/genotypische geslachtsverhoudingen te berekenen.

RAPPORTAGE VAN GEGEVENS

Statistische analyse

59. De LAGDA genereert drie vormen van gegevens die statistisch geanalyseerd moeten worden: 1) kwantitatieve continue gegevens (gewicht, SVL, LSI, VTG), 2) gegevens van het type tijd-tot-gebeurtenis voor ontwikkelingstempo's (d.w.z. dagen tot NF-stadium 62 vanaf het begin van de test) en 3) ordinale gegevens in de vorm van ernstscores of ontwikkelingsstadia op basis van histopathologische beoordelingen.
60. Het wordt aanbevolen dat de testopzet en de selectie van de statistische toets een voldoende groot onderscheidend vermogen waarborgen om biologisch significante veranderingen in de eindpunten op te sporen wanneer er een NOEC of ECx moet worden gerapporteerd. Statistische analyses van de gegevens (doorgaans op basis van duplogemiddelden) moeten bij voorkeur worden uitgevoerd volgens de procedures die zijn beschreven in *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (33). Aanhangsel 7 bij deze testmethode bevat de aanbevolen beslissingsboom voor de statistische analyse en een leidraad voor de behandeling van gegevens en voor de keuze van de meest geschikte statistische toets of het meest geschikte model voor de LAGDA.
61. De gegevens van de bemonstering van juvenielen (bv. groei, LSI) moeten voor elk genotypische geslacht afzonderlijk worden geanalyseerd aangezien voor alle kikkers het genotypische geslacht wordt bepaald.

Overwegingen met betrekking tot gegevensanalyse

Gebruik van gecompromitteerde duplo's en behandelingen

62. Het kan voorkomen dat duplo's of behandelingen gecompromitteerd raken als gevolg van overmatige sterfte door openlijke toxiciteit, ziekte of technisch falen. Als een behandeling gecompromitteerd raakt door ziekte of technisch falen, moeten er drie ongecompromitteerde behandelingen met drie ongecompromitteerde duplo's beschikbaar zijn voor analyse. Als er in de hooggeconcentreerde behandeling(en) openlijke toxiciteit optreedt, verdient het de voorkeur dat er ten minste drie ongecompromitteerde behandelingen met drie ongecompromitteerde duplo's beschikbaar zijn voor analyse (overeenkomstig de Maximum Tolerated Concentration (MTC-)benadering voor OESO-

testrichtlijnen (34)). Afgezien van sterfte kunnen tekenen van openlijke toxiciteit onder meer gedragseffecten zijn (bv. drijven aan de oppervlakte, liggen op de bakbodem, achteruit of onregelmatig zwemmen, niet boven water komen), morfologisch letsel (bv. bloeditstoringen, oedeem van de buik) of belemmering van normale voedingsresponsen in kwantitatieve vergelijking met controledieren.

Oplosmiddelcontrole

63. Bij het einde van de test moet een beoordeling van de potentiële effecten van het oplosmiddel (indien gebruikt) worden uitgevoerd. Hiertoe wordt een statistische vergelijking gemaakt tussen de oplosmiddelcontrolegroep en de verdunningswatercontrolegroep. De meest relevante eindpunten voor deze beoordeling zijn groeibepalingen (gewicht en lengte), omdat deze kunnen worden beïnvloed door gegeneraliseerde vormen van toxiciteit. Als er voor deze eindpunten statistisch significante verschillen worden gedetecteerd tussen de verdunningswatercontrolegroep en de oplosmiddelcontrolegroep, moet op basis van professioneel oordeel worden besloten of de validiteit van de test in het gedrang komt. Als de twee controles onderling afwijken, moeten de behandelingen die aan de teststof zijn blootgesteld, worden vergeleken met de oplosmiddelcontrole, tenzij bekend is dat vergelijking met de verdunningswatercontrole de voorkeur verdient. Als er geen statistisch significant verschil is tussen de twee controlegroepen, wordt aanbevolen de behandelingen die aan de teststof zijn blootgesteld te vergelijken met de gepoolde controlegroepen (oplosmiddel en verdunningswater), tenzij bekend is dat vergelijking met hetzij de verdunningswatercontrolegroep, hetzij de oplosmiddelcontrolegroep de voorkeur verdient.

Testverslag

64. In het testverslag moet het volgende worden opgenomen:

Teststof:

- fysische aard en, indien relevant, fysisch-chemische eigenschappen;
- 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 van onzuiverheden, indien van toepassing en praktisch haalbaar enz. (met inbegrip van het gehalte aan organische koolstof, indien van toepassing).
- 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.

Testsoort:

- Wetenschappelijke naam, stam indien beschikbaar, bron en verzamelmethode van de bevruchte eitjes en daaropvolgende behandeling.
- De incidentie van scoliose in de historische controles voor de gebruikte stamcultuur.

Testomstandigheden:

- fotoperiode(n);
- testopzet (bv. kamergrootte, materiaal en watervolume, aantal testkamers en duplo's, aantal testorganismen per duplo);
- wijze waarop de stamoplossingen werden bereid en verversingsfrequentie (indien een ontsluitingsmiddel is gebruikt, moeten de aard en de concentratie daarvan worden vermeld);
- methode voor het doseren van de teststof (bv. pompen, verdunningssystemen);
- de recovery van de methode en de nominale testconcentraties, de bepaalbaarheidsgrens, de gemiddelden van de gemeten waarden en standaarddeviaties in de testbakken en de methode waarmee die werden verkregen, en bewijs dat de metingen betrekking hebben op de concentraties van de teststof in ware oplossing;
- kenmerken van het verdunningswater: pH, hardheid, temperatuur, gehalte aan opgeloste zuurstof, restchloorgehalte (indien gemeten), totaalgehalte aan jodium, totaalgehalte aan organische koolstof (indien gemeten), zwevende deeltjes (indien gemeten), zoutgehalte van het testmedium (indien gemeten), alsmede de resultaten van eventuele andere metingen;
- de nominale testconcentraties, de gemiddelden van de meetwaarden en standaarddeviaties;
- de waterkwaliteit in testbakken: pH-graad, temperatuur (dagelijks) en opgeloste zuurstofconcentratie;
- gedetailleerde gegevens over de voeding (bv. het type voedsel, de leverancier, het rantsoen en de frequentie).

Resultaten:

- gegevens waaruit blijkt dat de controlegroepen voldeden aan de validiteitscriteria;

- gegevens voor de controlegroepen (plus oplosmiddelcontrole, indien toegepast) en de behandelingsgroepen als volgt: sterfte en waargenomen afwijkingen, tijd tot NF-stadium 62, schildklierhistologie (alleen bij larvaal monster), groei (gewicht en lengte), LSI (alleen bij steekproef van juvenielen), genetische/fenotypische geslachtsverhoudingen (alleen bij steekproef van juvenielen), resultaten histopathologische beoordeling voor geslachtsklieren, ei-/zaadleiders, nieren en lever (alleen bij juveniel monster) en VTG in plasma (alleen bij juveniel monster, indien uitgevoerd);
 - gebruikte aanpak voor de statistische analyse en de behandeling van gegevens (gebruikte statistische toets of gebruikt model);
 - concentratie waarbij geen effect wordt waargenomen (NOEC); voor elke beoordeelde respons;
 - laagste concentratie met waargenomen effecten (LOEC) voor elke beoordeelde respons (bij $\alpha = 0,05$); ECx voor elke beoordeelde respons, indien van toepassing, en betrouwbaarheidsintervallen (bv. 95 %) en een grafiek van het gepaste model dat werd gebruikt om deze waarde te berekenen, de helling van de concentratie/responscurve, de formule van het regressiemodel, de geraamde modelparameters en standaardfouten.
 - eventuele afwijkingen van de testmethode en afwijkingen van de aanvaardbaarheidscriteria en bespreking van mogelijke gevolgen voor de uitkomst van de test.
65. Voor de resultaten van eindpuntmetingen, moeten gemiddelde waarden en standaarddeviaties worden gepresenteerd (zo mogelijk per duplo en per concentratie).
66. De mediane tijd tot NF-stadium 62 moet worden berekend en gepresenteerd als gemiddelde van de duplomedianen en de standaarddeviatie daarvan. Evenzo moet voor de behandelingen een behandelingsmediaan worden berekend en gepresenteerd als gemiddelde van de duplomedianen en de standaarddeviatie daarvan.

LITERATUUR

- (1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.
- (2) OESO (2012a). 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.
- (3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.
- (4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1130: 16-27.
- (5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140-144.
- (6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1565.
- (7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281-285.
- (8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.
- (9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.
- (10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143-150.
- (11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

- (12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.
- (13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441-448.
- (14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321-327.
- (15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159-169.
- (16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.
- (17) Hoofdstuk C.4 van deze bijlage, bepaling van de gemakkelijke biologische afbreekbaarheid.
- (18) Hoofdstuk C.29 van deze bijlage, Gemakkelijke biologische afbreekbaarheid — CO₂ in gesloten vaten (gasruimtetest).
- (19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539-551.
- (20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593-9.
- (21) OESO (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.
- (22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

- (23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.
- (24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.
- (25) Hoofdstuk C.38 van deze bijlage, Amfibische metamorfosetest (AMA).
- (26) Hoofdstuk C.48 van deze bijlage, Test voor kortetermijneffecten op de voortplanting van vissen.
- (27) Hoofdstuk C.41 van deze bijlage, Geslachtelijke-ontwikkelingstest met vissen.
- (28) Hoofdstuk C.49 van deze bijlage, Acute toxiciteitstest bij visembryo's (FET, Fish Embryo acute Toxicity test).
- (29) OESO (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.
- (30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.
- (31) Luna LG and Coady K. (2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.
- (32) OESO (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.
- (33) OESO (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.
- (34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Apicaal eindpunt: veroorzaakt een effect op het niveau van de populatie.

Chemische stof: een stof of mengsel

Concentratie waarbij geen effect wordt waargenomen (No Observed Effect Concentration, NOEC): de testconcentratie direct onder de LOEC, die in vergelijking met de controle geen statistisch significant effect heeft ($p < 0,05$) binnen een aangegeven blootstellingsperiode.

Doorstroomtest: een test waarbij de testoplossingen constant door het testsysteem stromen gedurende de blootstellingsduur.

dpf: dagen na bevruchting

ECx: (Effect concentration for x % effect) is de concentratie die binnen een bepaalde blootstellingstijd x % van een effect op testorganismen veroorzaakt ten opzichte van een controle. De EC50 is bijvoorbeeld de geschatte concentratie die gedurende een bepaalde blootstellingsperiode bij 50 % van een blootgestelde populatie een effect op een testeindpunt zal hebben.

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

HPG-as: hypothalamus-hypofyse-gonade-as

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.

Laagste concentratie met waargenomen effecten (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC): de laagste geteste concentratie van een teststof waarbij de chemische stof een statistisch significant effect ($p \leq 0,05$) heeft vergeleken met de controlegroep. Alle testconcentraties boven de LOEC moeten echter een schadelijk effect hebben dat gelijk is aan of groter dan de effecten die worden waargenomen bij de LOEC. Indien niet aan deze beide voorwaarden kan worden voldaan, moet uitgebreid worden toegelicht hoe de LOEC (en daarmee de NOEC) is geselecteerd. Aanhangsel 7 bevat richtsnoeren hieromtrent.

Mediaan letale concentratie (LC50): de concentratie van een teststof waarvan geraamd wordt dat zij binnen de testduur 50 % van de blootgestelde testorganismen doodt.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

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

VTG: vitellogenine is een fosfolipoglycoproteïneprecursor van eidooierproteïne die gewoonlijk voorkomt bij seksueel actieve vrouwtjes van alle ovipare soorten.

Aanhangsel 2**ENKELE CHEMISCHE KENMERKEN VAN GESCHIKT VERDUNNINGSWATER**

Stof	Drempel-concentratie
Vaste deeltjes	5 mg/l
Totaalgehalte aan organische koolstof	2 mg/l
Niet-geïoniseerde ammoniak	1 µg/l
Restchloorgehalte	10 µg/l
Totaal organofosforpesticiden	50 ng/l
Totaalgehalte aan organochloorpesticiden en polychloorbifenylen	50 ng/l
Totaalgehalte aan organisch chloor	25 ng/l
Aluminium	1 µg/l
Arseen	1 µg/l
Chroom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Koper	1 µg/l
IJzer	1 µg/l
Lood	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Zink	1 µg/l
Cadmium	100 ng/l
Kwik	100 ng/l
Zilver	100 ng/l

Aanhangsel 3**TESTOMSTANDIGHEDEN VOOR DE LAGDA**

1. Testsoort	<i>Xenopus laevis</i>
2. Type test	Continue doorstroom,
3. Watertemperatuur	De nominale temperatuur is 21 °C. De gemiddelde temperatuur gedurende de hele test is 21 ± 1 °C (de verschillen tussen duplo's en tussen testgroepen mogen niet groter zijn dan 1,0 °C)
4. Belichtingskwaliteit	Fluorescentielampen (breed spectrum) 600-2000 lux (lumen/m ²) op het wateroppervlak
5. Fotoperiode	12 uur licht, 12 uur donker
6. Hoeveelheid testoplossing en testvat (bak)	4-10 l (ten minste 10–15 cm waterdiepte) Glazen of roestvrijstalen bak
7. Volumewisselingen van testoplossingen	Constant, ten behoeve van de instandhouding van de biologische omstandigheden en de blootstelling aan de teststof (bv. 5 verversingen van het bakvolume per dag)
8. Leeftijd van testorganismen bij start	Stadium 8-10 volgens Nieuwkoop en Faber (NF)
9. Aantal organismen per duplo	20 dieren (embryo's)/bak (duplo) bij begin blootstelling en 10 dieren (juvenielen)/bak (duplo) na NF-stadium 66 tot einde blootstelling
10. Aantal behandelingen	Minimaal 4 behandelingen met teststof plus geschikte controle(s)
11. Aantal duplo's per behandeling	4 duplo's per behandeling voor teststof en 8 duplo's voor de controle(s)
12. Aantal organismen per testconcentratie	Minimaal 80 dieren per behandeling voor teststof en minimaal 160 duplo's voor de controle(s)
13. Verdunningswater	Elk water waarin een normale groei en ontwikkeling van <i>X. laevis</i> mogelijk is (bv. bronwater of met koolstof gefilterd kraanwater)
14. Beluchting	Niet nodig, maar indien de gehalten opgeloste zuurstof onder de aanbevolen grenzen zakken en de doorstroming van de testoplossing tot het maximum wordt opgevoerd, is beluchting van de bakken mogelijk wel nodig.
15. Gehalte opgeloste zuurstof van de testoplossing	Opgeloste zuurstof: ≥ 40 % van de verzadigingswaarde van lucht of $\geq 3,5$ mg/l

- | | |
|---|---|
| 16. pH van de testoplossing | 6,5-8,5 (de verschillen tussen duplo's en tussen testgroepen mogen niet groter zijn dan 0,5) |
| 17. Hardheid en alkaliniteit van de testoplossing | 10-250 mg CaCO ₃ /l |
| 18. Voerschema | (Zie aanhangsel 4) |
| 19. Blootstellingsduur | Van NF-stadium 8-10 tot tien weken na de mediane tijd tot NF-stadium 62 in de water- en/of oplosmiddelcontrolegroep (maximaal 17 weken) |
| 20. Biologische eindpunten | Sterfte (en afwijkend uiterlijk), tijd tot NF-stadium 62 (larvaal monster), schildklierhistologie (larvaal monster), groei (gewicht en lengte), lever-somatische index (juveniel monster), genetische/fenotypische geslachtsverhoudingen (juveniel monster), histopathologie voor geslachtsklieren, ei-/zaadleiders, nieren en lever (juveniel monster) en vitellogenine in plasma (juveniel monster, optioneel) |
| 21. Geldigheidscriteria voor de test | Opgeloste zuurstof moet > 40 % verzadigingswaarde van lucht zijn; de gemiddelde watertemperatuur moet 21 ± 1 °C zijn en de verschillen tussen duplo's en tussen testgroepen moeten < 1,0 °C zijn; de pH van de testoplossing moet in het bereik van 6,5-8,5 liggen; de sterfte in de controle moet ≤ 20 % zijn in elke duplo, en de gemiddelde tijd tot NF-stadium 62 in de controle moet ≤ 45 dagen zijn; het gemiddelde gewicht van de testorganismen in NF-stadium 62 en bij het einde van de test moet in de controlegroepen en de oplosmiddelcontroles (indien toegepast) respectievelijk $1,0 \pm 0,2$ en $11,5 \pm 3$ g bereiken; er moet bewijs beschikbaar zijn waaruit blijkt dat de gehalten aan teststof in de oplossing binnen ± 20 % van de gemiddelde gemeten waarden zijn gehouden. |

Aanhangsel 4

VOERSHEMA

Er zij op gewezen dat, hoewel dit voerschema wordt aanbevolen, alternatieven geoorloofd zijn mits de testorganismen in een normaal tempo groeien en zich ontwikkelen.

Het voeren van de larven

Bereiding van het dieet voor de larven

- A. 1:1 (v/v) startvoer voor forellen: algen/TetraFin® (of gelijkwaardig);
1. Startvoer voor forellen: meng 50 g startvoer voor forellen (fijne korrels of poeder) en 300 ml geschikt gefilterd water gedurende 20 s op een hoge blenderstand
 2. Mengsel algen/TetraFin® (of gelijkwaardig): meng 121 g spirulina-algentabletten en 500 ml gefilterd water gedurende 40 s op een hoge blenderstand, meng 12 g TetraFin® (of gelijkwaardig) met 500 ml gefilterd water en voeg deze vervolgens samen tot 1 l met 12 g/l spirulina-algen en 12 g/l TetraFin® (of gelijkwaardig)
 3. Voeg gelijke volumes van het startvoer voor forellen in water en het algen/TetraFin®(of gelijkwaardig)-mengsel samen
- B. Pekelkreeftjes:

15 ml pekeldkreeftjeseitjes worden geïncubeerd in 1 l zout water (bereid door 20 ml NaCl toe te voegen aan 1 l gedeïoniseerd water). Na 24 uur beluchten bij kamertemperatuur onder constante belichting worden de pekeldkreeftjes geoogst. Door de belichting te stoppen kunnen de pekeldkreeftjes gedurende 30 min tot rust komen. De cysten die op het oppervlak van de bak drijven worden afgegoten en afgevoerd en de kreeftjes worden door geschikte filters gegoten en tot 30 ml aangevuld met gefilterd water.

Voerprotocol

In tabel 1 wordt een overzicht gegeven van het type en de hoeveelheid toegediend voer gedurende de larvale stadia van de blootstelling. De dieren moeten door de week driemaal per dag gevoerd worden en in het weekend eenmaal per dag.

Tabel 1: Voerschema voor *X. laevis*-larven in doorstroomomstandigheden

Tijd* (na bevruchting)	Startvoer voor forellen: algen/TetraFin® (of gelijkwaardig)		Pekelkreeftjes	
	Door de week (3 maal per dag)	Weekend (eenmaal per dag)	Door de week (tweemaal per dag)	Weekend (eenmaal per dag)
Dagen 4-14 (in Week 0-1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (Dag 8 tot 15)	0,5 ml (Dag 8 tot 15)

Week 2	0,67 ml	2,4 ml	1 ml (vanaf Dag 16)	1 ml (vanaf Dag 16)
Week 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Week 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Week 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
Week 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Week 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Week 8-10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

* Dag 0 wordt gedefinieerd als de dag waarop de hCG-injectie wordt gegeven.

Overgang van larvendieet naar juveniendieet

Wanneer de larven de volledige metamorfose hebben ondergaan, gaan ze over op een dieetformulering voor juvenielen die hieronder wordt uiteengezet. Tijdens deze overgang moet gaandeweg worden overgeschakeld van het larvendieet op het juvenienvoer. Dit kan worden gedaan door in elke groep van vijf kikkervisjes die NF-stadium 62 voorbij groeien en de voltooiing van de metamorfose in NF-stadium 66 naderen, het aandeel larvenvoer af te bouwen naarmate het aandeel juvenienvoer wordt opgebouwd.

Het voeren van de juvenielen

Juveniendieet

Zodra de metamorfose voltooid is (stadium 66) verandert het voerschema en wordt overgegaan op alleen 3/32 inch hoogwaardig zinkend kikkervoer (Xenopus Express™, FL, VS), of gelijkwaardig.

Bereiding van gebroken korrels voor de overgang van larvenvoer naar juvenienvoer

De korrels zinkend kikkervoer worden kort gemalen in een koffiemolen, blender of vijzel met stamper om de grootte van de korrels met ongeveer 1/3 terug te brengen. Te lang malen leidt tot poeder en wordt niet aanbevolen.

Voerprotocol

In **tabel 2** wordt een overzicht gegeven van het type en de hoeveelheid toegediend voer gedurende de juveniele en volwassen levensstadia. De dieren moeten eenmaal per dag worden gevoerd. Er zij op gewezen dat de dieren tijdens de metamorfose een deel pekelkreeftjes blijven krijgen totdat > 95 % van de dieren de metamorfose heeft voltooid.

Op de dag van het einde van de test mogen de dieren niet worden gevoerd, om te voorkomen dat het voedsel de gewichtsmeting verstoort.

Tabel 2: Voerschema voor *X. laevis*-juvenielen in doorstroomomstandigheden. Er zij op gewezen dat dieren die de metamorfose nog niet hebben voltooid, waaronder dieren waarbij de metamorfose is vertraagd door de chemische behandeling, geen ongebroken korrels kunnen eten.

Tijd (Weken na mediane metamorfosedatum)	Volume gebroken korrels (mg per kikkertje)	Volume hele korrels (mg per kikkertje)
Tijdens de metamorfose	25	0
Week 0-1	25	28
Week 2-3	0	110
Week 4-5	0	165
Week 6-9	0	220

* De eerste dag van Week 0 is de mediane metamorfosedatum bij de controledieren.

Aanhangsel 5

GENETISCHE GESLACHTSBEPALING (GENETISCH SEKSEN)

De methode voor het genetisch seksen van *Xenopus laevis* is gebaseerd op Yoshimoto *et al.*, 2008. Gedetailleerde procedures voor genotypering zijn zo nodig in deze publicatie te vinden. Er kunnen alternatieve methoden worden toegepast (bv. high-throughput qPCR) indien geschikt geacht.

X. laevis primers

DM-W marker

Forward: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Reverse: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Positieve controle

Forward: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Reverse: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Zuivering van het DNA

Zuiver DNA uit spier- of huidweefsel met behulp van bv. Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (cat # 69506) of een vergelijkbaar product volgens de instructies in de kit. Indien dit nodig wordt geacht voor PCR, kan het DNA met minder buffer uit de centrifugeerkolommen worden geëluëerd voor geconcentreerdere monsters. Omdat DNA zeer stabiel is, moet voorzichtigheid worden betracht om verkeerde karakterisering van mannetjes als vrouwtjes of vice versa als gevolg van kruisverontreiniging te voorkomen.

PCR

Een voorbeeldprotocol met JumpStart™ Taq van Sigma wordt weergegeven in **Tabel 1**.

Tabel 1: Voorbeeldprotocol met JumpStart™ Taq van Sigma

Mastermengsel	1x (µl)	[Einde]
NFW	11	-
10X buffer	2,0	-

MgCl ₂ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP's (elk 10 mM)	0,4	200 µM
Marker forward primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Marker reverse primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Controle forward primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Controle reverse primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 eenh./µl
DNA template	1,0	~200 pg/µl

Opmerking: Maak bij de bereiding van mastermengsels altijd extra om rekening te houden met verliezen die kunnen optreden bij het pipetteren (bv. 25x te gebruiken voor slechts 24 reacties).

Reactie:

Mastermengsel 19,0 µl

Template 1,0 µl

Totaal 20,0 µl

Thermocycler-profiel:

Stap 1: 94 °C 1 min

Stap 2: 94 °C 30 s

Stap 3: 60 °C 30 s

Stap 4: 72 °C 1 min

Stap 5: Ga verder met stap 2. 35 cycli

Stap 6: 72 °C 1 min

Stap 7: 4 °C bewaar

PCR-producten kunnen onmiddellijk in een gel worden gerund of bewaard bij 4 °C.

Agarosegel-elektroforese (3 %)(voorbeeldprotocol)

50X TAE

Tris 24,2 g

IJsazijn 5,71 ml

Na₂ (EDTA)·2H₂O 3,72 g

Voeg water toe tot 100 ml

1X TAE

H₂O 392 ml

50X TAE 8 ml

3:1 agarose

3 delen NuSieve™ GTG™ agarose

1 deel Fisher agarose met lage elektro-osmose (EEO)

Methode

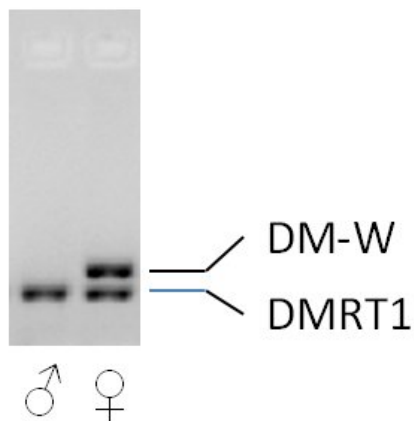
1. Bereid een 3 %-gel door 1,2 g agarosemix toe te voegen aan 43 ml 1X TAE. Zwenk om grote klonten uiteen te doen vallen.
2. Verwarm het agarosemengsel tot alles volledig is opgelost (vermijd overkoken). Laat iets afkoelen.
3. Voeg 1,0 µl ethidiumbromide toe (10 mg/ml). Zwenk de fles. NB: omdat ethidiumbromide mutageen is, moeten voor zover technisch mogelijk is, alternatieve chemische stoffen voor deze stap worden gebruikt om de gezondheidsrisico's voor werkers zoveel mogelijk te beperken¹.
4. Giet de gel in de mal met kam. Laat volledig afkoelen.
5. Leg de gel in de elektroforesebak. Bedek de gel met 1X TAE.
6. Voeg 1 µl 6x loading dye toe aan elke 10 µl PCR-product.
7. Pipetteer de monsters in de putjes.
8. Laat de gel ~20 minuten lopen bij een constante spanning van 160 V.

In **Figuur 1** is een agarosegel weergegeven waarin de bandenpatronen zichtbaar zijn die

¹ Overeenkomstig artikel 4, lid 1, van Richtlijn 2004/37/EG van het Europees Parlement en de Raad van 29 april 2004 betreffende de bescherming van de werknemers tegen de risico's van blootstelling aan carcinogene of mutagene agentia op het werk (zesde bijzondere richtlijn in de zin van artikel 16, lid 1, van Richtlijn 89/391/EEG van de Raad) (PB L 158 van 30.4.2004, blz. 50).

indicatief zijn voor mannetjes en vrouwtjes.

Figuur 1: Agarosegel waarin de bandenpatronen zichtbaar zijn die indicatief zijn voor een mannetje (♂) (één band bij ~203 bp: DMRT1) en voor een vrouwtje (♀) (twee banden bij ~259 bp: DM-W en 203 bp:DMRT1).



LITERATUUR

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2469-2474.

Aanhangsel 6

METING VAN VITELLOGENINE

Vitellogenine (VTG) wordt gemeten met behulp van een Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-(ELISA-)methode die oorspronkelijk ontwikkeld werd voor VTG bij de Amerikaanse dikkop-elritts (Parks *et al.*, 1999). Er zijn op dit moment geen antilichamen voor *X. laevis* in de handel verkrijgbaar, maar gegeven de grote hoeveelheid informatie over dit eiwit en de beschikbaarheid van kosteneffectieve commerciële diensten voor de productie van antilichamen, valt redelijkerwijs te verwachten dat laboratoria eenvoudig een ELISA kunnen ontwikkelen voor het doen van deze meting (Olmstead *et al.*, 2009). Bovendien geven Olmstead *et al.* (2009) een beschrijving van de test zoals gewijzigd voor VTG bij *X. tropicalis*. Deze is hieronder weergegeven. Bij deze methode wordt een antilichaam tegen *X. tropicalis*-VTG gebruikt, waarvan evenwel bekend is dat het ook werkt voor *X. laevis*-VTG. Er zij op gewezen dat ook niet-competitieve ELISA's kunnen worden gebruikt en dat deze lagere detectiegrenzen kunnen hebben dan de hieronder beschreven methode.

Materialen en reagentia

- Serum met gepreadsorbeerd 1e antilichaam

Meng 1 deel serum met het 1e anti-*X. tropicalis* VTG antilichaam met 2 delen plasma van controlemannetjes, laat ~ 75 minuten staan bij kamertemperatuur, zet 30 min op ijs, centrifugeer 1 uur lang met > 20K x G bij 4 °C, verwijder supernatant, verdeel in aliquots, bewaar bij -20 °C.

- 2e antilichaam

Geit-anti-konijn IgG geconjugeerd met HRP (bv. Bio-Rad 172-1019)

- VTG-standaard

gezuiverd *X. laevis* VTG van 3,3 mg/ml.

- TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) (bv. KPL 50-76-00; of Sigma T0440)
- Normaal geitens serum (NGS) (bv. Chemicon® S26-100 ml)
- EIA polystyreen microtiterplaatjes met 96 putjes (bv. ICN: 76-381-04, Costar:53590, Fisher:07-200-35)
- 37 °C hybridisatieoven (of snel equilibrerende luchtincubator) voor plaatjes, waterbad voor buisjes
- Overige gangbare laboratoriumuitrusting, -chemicaliën en -middelen.

Recepten

Coatingbuffer (50 mM carbonaatbuffer, pH 9,6):

NaHCO ₃	1,26 g
Na ₂ CO ₃	0,68 g
water	428 ml

10X PBS (0,1 M fosfaat, 1,5 M NaCl):

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,83 g
NaH ₂ PO ₄ ·7 H ₂ O	20,1 g
NaCl	71 g
water	810 ml

Wasbuffer (PBST):

10X TAE	100 ml
water	900 ml

Stel de pH op 7,3 met 1 M HCl en voeg vervolgens 0,5 ml Tween-20 toe

Testbuffer:

Normaal geitens serum (NGS)	3,75 ml
Wasbuffer	146,25 ml

Verzameling van monsters

Met een gehepariniseerd microhematocriet capillair buisje wordt bloed verzameld en op ijs gezet. Na 3 minuten centrifugeren wordt het buisje gescoord en opengeboren, en wordt het plasma overgebracht in 0,6 ml microcentrifugebuisjes met 0,13 eenheden gevriesdroogde aprotinine. (Deze buisjes worden van tevoren klaargemaakt door de gewenste hoeveelheid aprotinine toe te voegen, te bevriezen en vervolgens te vriesdrogen in een speedvac bij lage temperatuur.) Bewaar het plasma tot de analyse bij –80 °C.

Procedure voor één plaat

De plaat coaten

Meng 20 µl gezuiverd VTG met 22 ml carbonaatbuffer (uiteindelijke concentratie 3 µg/ml). Breng hiervan 200 µl in elk putje van een microtiterplaat met 96 putjes. Dek de plaat af met klevende afdichtingsfilm en incubeer 2 uur bij 37 °C (of bij 4 °C gedurende een nacht).

De plaat blokkeren

De blokkeeroplossing wordt bereid door 2 ml normaal geitenserum (NGS) toe te voegen aan 38 ml carbonaatbuffer. Verwijder de coatingoplossing en schud droog. Voeg aan elk putje 350 µl blokkeeroplossing toe. Dek af met klevende afdichtingsfilm en incubeer 2 uur bij 37 °C (of bij 4 °C gedurende een nacht).

De standaarden bereiden

5,8 µl gezuiverde VTG-standaard wordt gemengd met 1,5 ml testbuffer in een reageerbuisje van 12 x 75 mm van borosilicaatglas voor eenmalig gebruik. Dit geeft een concentratie van 12 760 ng/ml. Vervolgens worden seriële verdunningen gemaakt door 750 µl van de voorgaande verdunning toe te voegen aan 750 µl testbuffer voor uiteindelijke concentraties van 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 en 50 ng/ml.

De monsters voorbehandelen

Begin met een verdunning van 1:300 (bv. meng 1 µl plasma met 299 µl testbuffer) of 1:30 plasma in testbuffer. Als er een grote hoeveelheid VTG wordt verwacht, zijn er mogelijk aanvullende verdunningen of verdunningen van grotere hoeveelheden nodig. Probeer B/B₀ binnen het bereik van de standaarden te houden. Gebruik voor monsters zonder noemenswaardig VTG, bv. controlemannetjes en -vrouwtjes (die allemaal immatuur zijn), de verdunning van 1:30. Als monsters nog minder verdund worden kan dit tot ongewenste matrixeffecten leiden.

Bovendien wordt aanbevolen om op elke plaat een positief controlemonster te runnen. Dit monster komt uit een pool van plasma met hoog geïnduceerde VTG-gehalten. De pool wordt eerst verdund in NGS, in aliquots verdeeld en bewaard bij –80 °C. Voor elke plaat wordt een aliquot ontdooid, verder verdund in testbuffer en op dezelfde manier gerund als een testmonster.

Incuberen met 1e antilichaam

De oplossing met 1e antilichaam wordt bereid door een verdunning van 1:2 000 te maken van serum met gepreadsorbeerd 1e antilichaam in testbuffer (bv. 8 µl in 16 ml testbuffer). Meng in een glazen buisje 300 µl oplossing met 1e antilichaam met 300 µl monster/standaard. Op dezelfde manier wordt in het B₀-buisje 300 µl testbuffer gemengd met 300 µl antilichaam. Daarnaast moet een NSB-buisje (niet-specifieke binding) worden klaargemaakt met alleen 600 µl testbuffer, d.w.z. helemaal geen antilichaam. Dek de buisjes af met Parafilm en vortex rustig om te mengen. Incubeer 1 uur in een waterbad van 37 °C.

De plaat wassen

Was de plaat vlak voordat de incubatie van het 1e antilichaam klaar is. Schud hiertoe de inhoud uit op absorberend papier en dep droog. Vul vervolgens de putjes met 350 µl wasoplossing, gooi ze leeg en dep droog. Een meerkanaalspipet is hierbij handig. Herhaal

de wasstap nog tweemaal voor in totaal drie wasronden.

De plaat beladen

Verwijder nadat de plaat is gewassen de buisjes uit het waterbad en vortex ze licht. Voeg aan elk duploputje van de plaat 200 µl uit elk buisje met monster, standaard, B_0 , en NSB toe. Dek de plaat af met klevende afdichtingsfilm en incubeer 1 uur bij 37 °C.

Incuberen met 2e antilichaam

Aan het einde van de incubatie van de vorige stap moet de plaat opnieuw driemaal gewassen worden, zoals hierboven beschreven. Het verdunde 2^e antilichaam wordt bereid door 2,5 µl van het 2^e antilichaam te mengen met 50 ml testbuffer. Breng 200 µl verdund 2^e antilichaam in elk putje, dek af als hierboven, en incubeer 1 uur bij 37 °C.

Het substraat toevoegen

Was aan het einde van de incubatie met het 2e antilichaam de plaat driemaal, zoals hierboven beschreven. Breng dan 100 µl TMB-substraat in elk putje. Laat 10 minuten reageren, bij voorkeur niet bij fel licht. Stop de reactie door 100 µl 1 M fosforzuur toe te voegen. Hierdoor zal de kleur veranderen van blauw in fel geel. Meet de absorptie bij 450 nm met een afleesapparaat.

B/B₀ berekenen

Trek van alle metingen de gemiddelde NSB-waarde af. De B/B₀ voor elk monster en elke standaard wordt berekend door de absorptie (B) te delen door de gemiddelde absorptie van het B₀-monster.

De standaardcurve maken en de onbekende hoeveelheden bepalen

Genereer een standaardcurve met behulp van een grafiekprogramma op de computer (bv. SlidewriteTM of Sigma Plot[®]) dat de waarde van B/B₀ voor het monster extrapoleert op basis van de B/B₀ van de standaarden. Doorgaans wordt de waarde uitgezet op een logaritmische schaal en heeft de curve een sigmoïde vorm. Bij gebruik van een reeks dicht bij elkaar liggende standaarden kan de curve echter lineair eruitzien. Corrigeer de monsterhoeveelheden voor de verdunningsfactor en rapporteer ze als mg VTG/ml plasma.

De onderste detectiegrenzen bepalen

Voor bij normale mannetjes is het vaak niet duidelijk hoe de resultaten voor lage waarden gerapporteerd moeten worden. In deze gevallen moet het 95 %-betrouwbaarheidsinterval worden gebruikt om te bepalen of de waarde als nul moet worden gerapporteerd of als een ander getal. Als het resultaat voor het monster binnen het betrouwbaarheidsinterval van de nulstandaard (B_0) valt, moet het resultaat als nul worden gerapporteerd. De onderste detectiegrens is de laagste standaard die systematisch afwijkt van de nulstandaard; d.w.z. waarbij de twee betrouwbaarheidsintervallen niet overlappen. Als het resultaat voor het

monster binnen of boven het betrouwbaarheidsinterval van de onderste detectiegrens ligt, moet de berekende waarde worden gerapporteerd. Als het monster tussen de intervallen voor de nulstandaard en de onderste detectiegrens valt, moet de helft van de onderste detectiegrens als waarde voor dat monster worden gerapporteerd.

LITERATUUR

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113-125.

Aanhangsel 7

STATISTISCHE ANALYSE

De LAGDA genereert drie vormen van gegevens die statistisch geanalyseerd moeten worden: 1) kwantitatieve continue gegevens, 2) gegevens van het type tijd-tot-gebeurtenis voor ontwikkelingstempo's (tijd tot NF-stadium 62) en 3) ordinale gegevens in de vorm van ernstscores of ontwikkelingsstadia op basis van histopathologische beoordelingen. In figuur 1 wordt de aanbevolen beslissingsboom voor de statistische analyse van de LAGDA weergegeven. Daarnaast worden hieronder enige aanwijzingen gegeven die van pas kunnen komen bij de statistische analyse van de metingen uit de LAGDA. Wat betreft de analysebeslissingsboom moeten de resultaten van de metingen voor sterfte, groei (gewicht en lengte) en lever-somatische index (LSI) geanalyseerd worden volgens de tak "Andere eindpunten".

Continue gegevens

Gegevens voor continue eindpunten moeten eerst gecontroleerd worden op monotonie door de gegevens op rang te transformeren, een variantieanalyse (ANOVA) uit te voeren en de lineaire en kwadratische contrasten te vergelijken. Als de gegevens monotoon zijn, moet een stap-omlaag-trendtoets van Jonckheere-Terpstra worden uitgevoerd op de duplomedianen en hoeven er geen verdere analyses te worden verricht. Een alternatief voor gegevens die normaal verdeeld zijn met homogene varianties is de stap-omlaag-Williams-toets. Als de gegevens niet-monotoon zijn (kwadratisch contrast is significant en het lineaire niet), moeten ze worden geanalyseerd aan de hand van een ANOVA-model met gemengde effecten. Vervolgens moeten de gegevens worden beoordeeld op normale verdeling (bij voorkeur met behulp van de toets van Shapiro-Wilk of Anderson-Darling) en homogene variantie (bij voorkeur met behulp van de toets van Levene). Beide tests worden uitgevoerd op de residuen van een ANOVA-model met gemengde effecten. In plaats van deze formele tests kan ook het oordeel van deskundigen over de normale verdeling en de homogene variantie worden gebruikt, al gaat de voorkeur uit naar de formele tests. Als de gegevens normaal zijn verdeeld met homogene variantie is aan de aannamen van een ANOVA met gemengde effecten voldaan en wordt een significant testeffect bepaald met de toets van Dunnett. Wanneer een niet-normale verdeling of heterogene variantie wordt geconstateerd, is niet aan de aannamen van de toets van Dunnett voldaan en moet naar een normaliserende, variantiedependende transformatie worden gestreefd. Wanneer een dergelijke transformatie niet wordt gevonden, wordt een significant testeffect bepaald met de toets van Dunn. Waar mogelijk moet een eenzijdige toets worden uitgevoerd en geen tweezijdige, maar er dient op basis van deskundig oordeel te worden bepaald welke voor een gegeven eindpunt geschikt is.

Sterfte

Sterftegegevens moeten worden geanalyseerd over de hele duur van de test en moeten worden uitgedrukt als het aandeel gestorven dieren in elke bak. Kikkervisjes die de

metamorfose niet in de gegeven tijdsspanne voltooien, kikkervisjes in het cohort van de subbemonstering van larven, juveniele kikkers die gedood worden bij de uitdunning en eventuele dieren die sterven als gevolg van fouten van degene die de test uitvoert, moeten worden behandeld als gecensureerde gegevens en moeten niet in de noemer van de percentageberekening worden meegeteld. Voorafgaand aan de statistische analyses moet op de sterftepercentages een hoektransformatie (arcsinus-transformatie) worden toegepast. Een alternatief hiervoor is om de stap-omlaagtoets van Cochran-Armitage te gebruiken, eventueel met een correctie van Rao-Scott in geval van overdispersie.

Gewicht en lengte (groeigegevens)

Tijdens de metamorfose zijn mannetjes en vrouwtjes niet seksueel dimorf, dus de groeigegevens voor de subbemonstering van larven moeten geslachtsafhankelijk worden geanalyseerd. De juveniele groeigegevens moeten echter wel afzonderlijk per genetisch geslacht worden geanalyseerd. Er kan voor deze eindpunten een log-transformatie nodig zijn, aangezien een logaritmisch normale verdeling voor groottegegevens niet ongebruikelijk is.

Lever-somatische index (LSI)

Levergewichten moeten worden genormaliseerd als proportie van het gewicht van het hele lichaam (d.w.z. lever-somatische index) en afzonderlijk per genetisch geslacht worden geanalyseerd.

Tijd tot NF-stadium 62

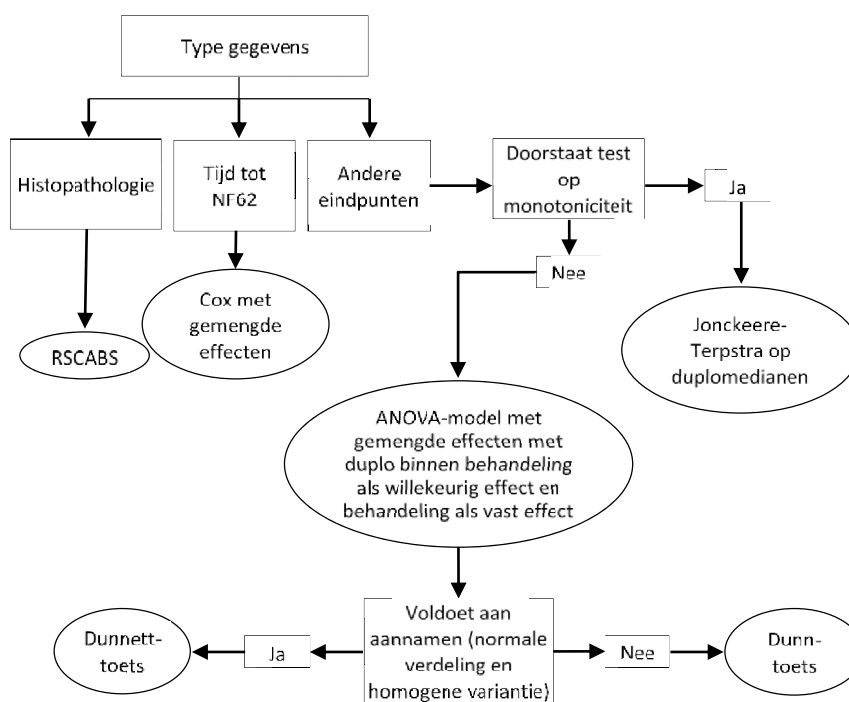
Gegevens over de tijd tot metamorfose moeten worden behandeld als gegevens van het type tijd-tot-gebeurtenis, waarbij sterfgevallen of dieren die niet binnen 70 dagen NF-stadium 62 bereiken, worden behandeld als rechtsgecensureerde gegevens (d.w.z. de ware waarde is groter dan 70 dagen, maar het onderzoek is afgelopen voordat de dieren binnen 70 dagen NF-stadium 62 hebben bereikt). Voor het bepalen van de datum van het einde van de test moet de mediane tijd tot NF-stadium 62, de voltooiing van de metamorfose in verdunningswatercontroles, worden gebruikt. De mediane tijd tot voltooiing van de metamorfose kan worden bepaald aan de hand van Kaplan-Meier product-limietschatters. Het eindpunt moet worden geanalyseerd met behulp van een proportioneel-risicomodel van Cox met gemengde effecten, waarbij rekening wordt gehouden met de duplostructuur van het onderzoek.

Histopathologiegegevens (ernstscores en ontwikkelingsstadia)

De histopathologiegegevens hebben de vorm van ernstscores of ontwikkelingsstadia. In een zogenaamde RSCABS-toets (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) wordt een stap-omlaag-trendtoets van Cochran-Armitage gebruikt met een correctie van Rao-Scott op elk ernstniveau van een histopatologische respons (Green *et al.*, 2014). Door de correctie van Rao-Scott wordt de experimentele opzet met duplo's in de test in aanmerking genomen. De "by Slices"-procedure verdisconteert de biologische verwachting dat de ernst van een

effect doorgaans toeneemt naarmate doses of concentraties worden verhoogd, terwijl de scores van de afzonderlijke dieren worden behouden en de ernst van elk gevonden effect zichtbaar wordt. De RSCABS-procedure bepaalt niet alleen welke behandelingen statistisch verschillend zijn van de controles (d.w.z. ernstiger pathologie vertonen dan de controles), maar stelt ook vast bij welke ernstscore het verschil optreedt, hetgeen de analyse de benodigde context verschaft. Wat betreft de bepaling van het ontwikkelingsstadium van geslachtsklieren en ei-/zaadleiders, moeten de gegevens een extra bewerking ondergaan omdat een van de aannamen van de RSCABS is dat de ernst van het effect toeneemt met de dosis. Het waargenomen effect kan een vertraging of versnelling van de ontwikkeling zijn. Daarom moeten gegevens met betrekking tot het ontwikkelingsstadium worden geanalyseerd als gerapporteerd om een eventuele versnelde ontwikkeling te detecteren en vervolgens handmatig worden geïnverteerd voor een tweede analyse om een eventuele vertraagde ontwikkeling te detecteren.

Figuur 1: Beslissingsboom voor de statistische analyse van LAGDA-gegevens.



LITERATUUR

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 1108-1116.

Aanhangsel 8

OVERWEGINGEN VOOR HET MONITOREN EN MINIMALISEREN VAN HET OPTREDEN VAN SCOLIOSE

Idiopathische scoliose manifesteert zich bij *Xenopus laevis*-kikkervisjes doorgaans aan als een "kromme staart" en kan de waarnemingen op het vlak van morfologie en gedrag in de testpopulaties bemoeilijken. Er moet naar gestreefd worden de incidentie van scoliose te minimaliseren of uit te sluiten, zowel in de stamcultuur als onder testomstandigheden. In de uiteindelijke test wordt aanbevolen dat de prevalentie van matige en ernstige scoliose onder de 10 % blijft om de betrouwbaarheid van het vermogen van de test om ontwikkelingseffecten als gevolg van de behandeling bij anderszins gezonde amfibielarven te detecteren, te verbeteren.

In de dagelijkse waarnemingen in de loop van de uiteindelijke test moeten zowel de incidentie (aantal dieren) als de ernst van de scoliose, indien aanwezig, worden geregistreerd. De aard van de afwijking moet worden beschreven voor wat betreft de plaats (bv. voor of achter de anus) en de richting van de kromming (bv. lateraal of van dorsaal naar ventraal). De ernst kan als volgt worden gescoord:

(NR) niet zichtbaar (not remarkable): geen kromming aanwezig

- 1) Minimaal: lichte, laterale kromming achter de anus; alleen zichtbaar in rust
- 2) Matig: laterale kromming achter de anus; op elk moment zichtbaar, maar belemmert de beweging niet
- 3) Ernstig: laterale kromming voor de anus; OF elke kromming die de beweging belemmert; OF elke dorsaal-naar-ventrale kromming

Een raadgevend wetenschappelijk comité van het Amerikaanse Environmental Protection Agency (EPA) over de federale wet inzake insecticiden, fungiciden en rodenticiden (FIFRA SAP 2013) heeft de samengevatte gegevens voor scoliose van vijftien amfibische metamorfosetests (AMA) met *X. laevis* (NF-stadium 51 tot 60+) naast elkaar gelegd en algemene aanbevelingen geformuleerd om de prevalentie van deze afwijking in testpopulaties te beperken. Deze aanbevelingen zijn ook relevant voor de LAGDA, ook al is het ontwikkelingstijdpad in deze test langer dan voor de AMA.

Historische voortplantingsgegevens

In zijn algemeenheid moeten gezonde volwassen dieren van hoge kwaliteit als broedpaartjes worden gebruikt; door uitsluiting van broedpaartjes die nageslacht met scoliose voortbrengen, kan het optreden daarvan in de loop van de tijd worden beperkt. Het kan in het bijzonder gunstig zijn om zo min mogelijk gebruik te maken van in het wild gevangen

kweekdieren. De blootstellingsperiode in de LAGDA begint met embryo's in NF-stadium 8 tot 10 en het is aan het begin van de test niet mogelijk om te bepalen of bepaalde dieren scoliose zullen vertonen. Afgezien van de monitoring van de incidentie van scoliose bij de dieren die in de test worden opgenomen, moeten daarom de historische legprestaties (met inbegrip van de prevalentie van scoliose bij larven die de kans krijgen zich te ontwikkelen) gedocumenteerd worden. Het kan nuttig zijn om het deel van elk legsel dat niet in een bepaald onderzoek wordt gebruikt, te blijven monitoren en van deze waarnemingen verslag te leggen (FIFRA SAP 2013).

Waterkwaliteit

Het is van belang om toe te zien op de waterkwaliteit, zowel voor het laboratoriumbestand als gedurende de test. Behalve de waterkwaliteitscriteria die stelselmatig worden beoordeeld voor aquatischetoxiciteitstests, kan het nuttig zijn om te controleren op nutriëntentekorten en deze zo nodig te corrigeren (bv. tekort aan vitamine C, calcium, fosfor) of op overmatige gehalten aan seleen en koper, waarvan beschreven is dat deze in uiteenlopende mate scoliose veroorzaken bij in het laboratorium gekweekte *Rana* sp. en *Xenopus* sp. (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; zoals vermeld in FIFRA SAP 2013). Het volgen van een passend dieetschema (zie aanhangsel 4) en het goed schoonhouden van de bakken zal de kwaliteit van het water en de gezondheid van de proefdieren over het algemeen ten goede komen.

Voer

In aanhangsel 4 worden specifieke aanbevelingen gedaan voor een dieetschema waarvan gebleken is dat het goede resultaten oplevert voor de LAGDA. Aanbevolen wordt de voedingsbronnen te controleren op biologische toxinen, herbiciden en andere gewasbeschermingsmiddelen waarvan bekend is dat ze bij *X. laevis* of andere waterdieren scoliose veroorzaken (Schlenk en Jenkins 2013). Zo is de blootstelling aan bepaalde cholinesteraseremmers in verband gebracht met scoliose bij vissen (Schultz *et al.* 1985) en kikkers (Bacchetta *et al.* 2008).

LITERATUUR

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. *Science of the Total Environment* 392: 110 – 118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. *Toxicology* 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. *Journal of the World Aquaculture Society* 13:

322-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraiez, and P. Herraiez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314-320.

Schlenk, D., and Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. May 21-23, 2013. Washington, DC. "