II

(Besluiten waarvan de publikatie niet voorwaarde is voor de toepassing)

COMMISSIE

RICHTLIJN VAN DE COMMISSIE

van 18 november 1987

houdende negende aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van Richtlijn 67/548/EEG van de Raad betreffende de aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen inzake de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke stoffen

(87/302/EEG)

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Economische Gemeenschap,

Gelet op Richtlijn 67/548/EEG van de Raad van 27 juni 1967 betreffende de aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen inzake de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke stoffen (1), voor de zesde maal gewijzigd bij Richtlijn 79/831/EEG (2), inzonderheid op artikel 19,

Overwegende dat in artikel 3, lid 1, van Richtlijn 67/548/EEG is bepaald dat de fysisch-chemische eigenschappen en de toxiciteit en ecotoxiciteit van de stoffen en preparaten volgens de in bijlage V genoemde methoden worden vastgesteld;

Overwegende dat in artikel 3, lid 2, van Richtlijn 67/548/EEG is bepaald dat het reële of potentiële gevaar van een stof of preparaat voor het milieu aan de hand van de in de bijlagen VII en VIII genoemde kenmerkende eigenschappen worden beoordeeld;

Overwegende dat bijlage V in de versie van Richtlijn 84/449/EEG van de Commissie (3) thans alleen testmethoden bevat voor de in bijlage VII vermelde eigenschappen; dat ook testmethoden voor de in bijlage VIII vermelde eigenschappen ter beschikking moeten komen;

Overwegende dat de bepalingen van deze richtlijn in overeenstemming zijn met het advies van het Comité voor de aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van de richtlijnen betreffende de opheffing van technische handelsbelemmeringen in de sector gevaarlijke stoffen en preparaten,

HEEFT DE VOLGENDE RICHTLIJN VASTGESTELD:

Artikel 1

Aan bijlage V van Richtlijn 67/548/EEG wordt de tekst van de bijlage bij deze richtlijn toegevoegd.

Artikel 2

De Lid-Staten dienen vóór 31 december 1988 de bepalingen vast te stellen en bekend te maken die nodig zijn om aan deze richtlijn te voldoen. Zij stellen de Commissie hiervan onmiddellijk in kennis. Zij passen deze bepalingen uiterlijk op 30 juni 1989 toe.

Artikel 3

Deze richtlijn is gericht tot de Lid-Staten.

Gedaan te Brussel, 18 november 1987.

Voor de Commissie
Stanley CLINTON DAVIS
Lid van de Commissie

(1) PB nr. 196 van 16. 8. 1967, blz. 1.
(2) PB nr. L 259 van 15. 10. 1979, blz. 10.
(3) PB nr. L 251 van 19. 9. 1984, blz. 1.

BIJLAGE

De hier beschreven testmethoden dienen voor de bepaling van sommige van de toxicologische en ecotoxicologische eigenschappen, vermeld in bijlage VIII van Richtlijn 79/831/EEG van de Raad. Er zijn passende testmethoden voor niveau 1 en niveau 2 van bijlage VIII beschreven, maar de tests zijn niet naar niveau onderverdeeld.

INHOUD

	blz.
DEEL B: Methoden voor de bepaling van de toxiciteit	4
Algemene inleiding	4
Subchronische orale toxiciteitstest — 90 dagen-test met herhaalde orale toediening aan knaagdiersoorten	8
Subchronische orale toxiciteitstest — 90 dagen-test met herhaalde orale toediening aan niet-knaagdiersoorten	12
Subchronische dermale toxiciteitstest — 90 dagen-test met herhaalde dermale toediening aan knaagdiersoorten	16
Subchronische inhalatietoxiciteitstest — 90 dagen-test met herhaalde inhalatoire toediening aan knaagdiersoorten	20
Teratogeniteitsonderzoek	24
Chronische toxiciteitstest	27
Carcinogeniteitsonderzoek	32
Gecombineerde chronische toxiciteit/carcinogeniteitstest	37
Reproduktietoxiciteitsonderzoek over één generatie	43
Reproduktietoxiciteitsonderzoek over twee generaties	47
Toxicokinetiek	51
Mutageniteitsonderzoek en screening op carcinogenese	55
— Genmutatie — Saccharomyces cerevisiae	55
— Mitotische recombinatie — Saccharomyces cerevisiae	58
— Genmutatietest — zoogdierencellen in vitro	61
— DNA-beschadiging en herstel — DNA-herstelsynthese — zoogdierencellen in vitro	64
— Zusterchromatiden-uitwisselingstest in vitro	68
— Geslachtsgebonden recessieve letaliteitstest met Drosophila melanogaster	71
— Zoogdierenceltransformatietest in vitro	73
— Onderzoek naar dominante letale mutaties bij knaagdieren	76
— Cytogenetica van geslachtscellen bij zoogdieren	79
— Vlekkentest bij muizen	82
— Erfelijke translocatie bij de muis	85
DEEL C: Methoden voor de bepaling van de ecotoxiciteit	88
Algemene inleiding	88
Remmingstest voor algen	89
Toxiciteit voor regenwormen: Test met kunstmatige grond	95
Biologische afbraak: Zahn-Wellens test	99
Biologische afbraak: Simulatieproeven actief slib	106
Biologische afbraak: Actief slib: Remming ademhaling	118
Biologische afbraak: Gewijzigde SCAS-test	123

DEEL B: METHODEN VOOR DE BEPALING VAN DE TOXICITEIT

ALGEMENE INLEIDING

ONDERZOEK MET LANGDURIGE BLOOTSTELLING

Subchronische en chronische toxiciteit en carcinogeniteit

Aard van de teststof en het behandelingsmengsel

De samenstelling van de teststof, de belangrijkste verontreinigingen inbegrepen, en zijn relevante fysisch-chemische eigenschappen, inclusief de stabiliteit, dienen bekend te zijn voordat met een toxiciteitsonderzoek wordt begonnen.

De fysisch-chemische eigenschappen van de teststof verschaffen immers belangrijke informatie voor de keuze van de toedieningsweg, de opzet van studies naar de (sub)chronische toxiciteit of carcinogeniteit en het omgaan met en het bewaren van de teststof.

Informatie over de chemische structuur en de fysisch-chemische eigenschappen kan ook een indicatie verschaffen over de wijze waarop de stof via de voorgenomen toedieningsweg wordt opgenomen, waarop de stofwisseling plaatsvindt en hoe de verdeling over het weefsel geschiedt. Uit eerdere toxiciteits- en toxicokinetische studies is wellicht ook informatie over toxicokinetische parameters voorhanden.

Voordat met het onderzoek wordt begonnen, dient een analytische methode te worden ontwikkeld voor de kwalitatieve en kwantitatieve bepaling van de teststof (indien mogelijk ook de belangrijkste verontreinigingen) in het medium waarin de toediening geschiedt en biologisch materiaal.

Proefdieren: selectie van soort en stam

Aangezien de dieren gedurende het grootste deel van hun levensduur moeten worden behandeld, beperkt het onderzoek zich gewoonlijk tot gemakkelijk te houden proefdiersoorten met een relatief korte levensduur. Bekendheid met de incidentie van spontane ziekten en tumoren bij de gebruikte dierstam wanneer deze onder soortgelijke omstandigheden wordt gehouden, is ten zeerste gewenst.

De stammen dienen nauwkeurig te worden gekarakteriseerd en vrij te zijn van proefverstorende aangeboren afwijkingen. Het gebruik van inteeltstammen of F1-hybriden biedt in dit opzicht een aantal voordelen, maar als er voldoende achtergrondinformatie voorhanden is over niet-ingeteelde stammen, waarvoor dieren uit besloten voorraden worden gebruikt, zijn ook deze stammen aanvaardbaar.

Dierverzorging, voer en drinkwatervoorziening

Dierproeven dienen te worden uitgevoerd overeenkomstig de in elk land geldende voorschriften, waarbij men zich tevens moet laten leiden door de geldende ethische beginselen en internationale ontwikkelingen op het gebied van het welzijn van de dieren.

Wil men zinvolle resultaten verkrijgen, dan zijn een strenge controle op de leefomstandigheden en een goede verzorging van de dieren een eerste vereiste. Factoren als behuizing, voorkomende ziekten, behandeling met geneesmiddelen, verontreinigingen in voedsel, lucht, water en beddingmateriaal, alsmede de algemene dierverzorging, kunnen de resultaten van studies waarbij met herhaalde doseringen wordt gewerkt, aanmerkelijk beïnvloeden. In het algemeen dient het effect van chemische desinfectantia op het onderzoek bekend te zijn.

Bij de samenstelling van het voedsel moet rekening worden gehouden met alle eisen die de proefdiersoorten aan hun voedsel stellen. Het voedsel dient vrij te zijn van verontreinigingen, die de proefresultaten zouden kunnen beïnvloeden. Knaagdieren dienen eten en drinken ad libitum te krijgen; het voedsel dient ten minste eenmaal per week te worden ververst. Op het ogenblik worden drie soorten voedsel gebruikt: normaal, synthetisch en voedsel zonder voorgeschreven samenstelling.

Voor welk type voedsel ook wordt gekozen, de leveranciers dienen door middel van periodieke controle de voedingswaarde en de hoeveelheid contaminanten in de basisvoeding te bepalen en deze gegevens bij elke partij voer aan het laboratorium te verstrekken. Bekendheid met de effecten van het voedsel op de stofwisseling alsook op de ontwikkeling van tumoren en de levensduur van de dieren is ten zeerste gewenst.

Daarnaast kan de basisvoeding door het testlaboratorium worden geanalyseerd op voedingsbestanddelen en ongewenste contaminanten, carcinogenen inbegrepen. In dat geval dienen de analyseresultaten te worden vastgelegd en opgenomen in het eindrapport over elke teststof.

Gewone voedingsbestanddelen waarvan bekend is dat zij een invloed hebben op het ontstaan van kanker (bij voorbeeld antioxidanten, onverzadigde vetzuren, selenium) mogen niet in storende concentraties aanwezig zijn. Het mogelijke effect van een aantal algemeen voorkomende contaminanten in de voeding op de carcinogeniteitsbepaling vereist dat speciale aandacht wordt geschonken aan de aanwezigheid in de voeding van residuen van pesticiden, organische chloorverbindingen en polycyclische aromatische koolwaterstoffen, oestrogenen, zware metalen, nitrosamines en mycotoxinen.

Wanneer de teststof in het water of voedsel wordt toegediend, zijn stabiliteitsproeven een eerste vereiste. Op de juiste wijze uitgevoerde stabiliteits- en homogeniteitsproeven voorafgaande aan studies waarbij met herhaalde doseringen wordt gewerkt, dienen te worden gebruikt om de vereiste frequentie van voedselbereiding en -controle vast te stellen.

Wanneer het voedsel wordt gesteriliseerd, dient men bekend te zijn met de effecten hiervan op de teststof en de voedingsbestanddelen. Alle vereiste aanpassingen dienen te worden aangebracht.

Bij carcinogeniteitsproeven dienen de onderzoekers te letten op eventuele contaminanten in het gebruikte water. In het algemeen volstaat water dat geschikt is voor menselijke consumptie; wel dient de samenstelling ervan bekend te zijn.

De concentratie van een teststof in het voedsel zal eventueel moeten worden aangepast naarmate de dieren groeien, ten einde ervoor te zorgen dat de opname van de teststof in relatie tot het lichaamsgewicht redelijk constant blijft.

De voedingswaarde van het voedsel in controle- en testgroep dient zoveel mogelijk gelijk te zijn. Er zal dus rekening moeten worden gehouden met de voedingswaarde van een aan het voedsel toegevoegde teststof. De ervaring leert dat maximaal 5 % aan teststoffen zonder voedingswaarde in het dieet geen invloed van enige betekenis heeft op de voedende waarde van het voedsel.

1. Inhalatiestudies

Er wordt geen hoogste te testen dosis vermeld, omdat het niet mogelijk is gebleken een enkele grenswaarde voor inhalatoire blootstelling vast te stellen.

2. Teratogeniteitsonderzoek

De testmethode is in de eerste plaats gericht op orale toediening. Afhankelijk van de fysische eigenschappen van de teststof of de vermoedelijke blootstellingswijze van de mens, mogen ook andere toedieningswegen worden gebruikt. De testmethode dient dan dienovereenkomstig te worden aangepast, waarbij de bruikbare elementen van de 28-daagse- testmethoden in aanmerking worden genomen.

3. Toxicokinetiek

Toxicokinetische studies zijn een hulpmiddel bij de interpretatie en beoordeling van toxiciteitsgegevens. Deze onderzoekingen hebben ten doel bepaalde aspecten van de toxiciteit van de beproefde stof op te helderen waarbij de resultaten nuttig kunnen zijn voor het opzetten van verdere toxiciteitsstudies. Het is niet de bedoeling dat alle parameters in alle gevallen bepaald moeten worden. Slechts in uitzonderlijke gevallen zal de volledige reeks van toxicokinetische studies (opname, uitscheiding, distributie en omzetting) noodzakelijk zijn. Voor bepaalde verbindingen kan het aanbeveling verdienen deze volgorde te wijzigen of kan met een proef met één dosis worden volstaan.

Definities

Toxicokinetiek:	de studie van de opname, distributie, omzetting en uitscheiding van toxische stoffen.
Opname:	het (de) proces(sen) waardoor een toegediende stof in het lichaam wordt opgenomen.
Uitscheiding:	het (de) proces(sen) waardoor de toegediende stof en/of zijn metabolieten uit het lichaam worden verwijderd.
Distributie:	het (de) proces(sen) waardoor de opgenomen stof en/of zijn metabolieten zich in het lichaam verdelen.
Omzetting:	het (de) proces(sen) waardoor de chemische structuur van de toegediende stof door enzymatische of non-enzymatische reacties in het lichaam wordt veranderd.

4. Acuut en subacuut onderzoek met een tweede diersoort

Het doel van een onderzoek met een tweede diersoort is de uit het eerste onderzoek getrokken conclusies aan te vullen.

Voor een onderzoek met een tweede diersoort kan de reeds beschreven proefmethode worden gebruikt of aangepast voor een kleiner aantal dieren.

5. Vruchtbaarheidsonderzoek

Indien een reproduktieproef over drie generaties noodzakelijk is, kan de voor reproduktieproeven over twee generaties beschreven methode worden uitgebreid tot drie generaties.

6. Mutageniteitsonderzoek

Nader mutageniteitsonderzoek, screening-onderzoek naar carcinogene eigenschappen inbegrepen

In bijlage VIII van de richtlijn worden aanvullende studies voor nader onderzoek van de mutageniteit of voor prescreening inzake carcinogeniteit vermeld. De in dit gedeelte geschetste onderzoekingen kunnen in het algemeen voor het onderzoek van beide aspecten worden gebruikt.

Inleiding

Het voorafgaande onderzoek naar de mutagene activiteit van een stof bestaat uit toetsen om gen (punt) mutaties bij bacteriën en cytogenetische beschadigingen in zoogdiercellen (in vitro of in vivo) vast te stellen; passende methoden voor deze onderzoekingen uit het „basisdossier" werden eerder beschreven. In dit gedeelte worden aanvullende onderzoekingen behandeld waarmee de resultaten uit het basisdossier kunnen worden geverifieerd en/of aangevuld. Deze onderzoekingen kunnen voor een aantal doeleinden worden gebruikt:

1. ter bevestiging van de resultaten van het basisdossier;
2. ter bestudering van genetische eindpunten die in het onderzoek voor het basisdossier niet zijn bestudeerd;
3. voor het aanvangen of uitbreiden van in vivo onderzoekingen.

Daartoe bevat de reeks beschreven testen zowel in vitro als in vivo eukaryootsystemen en een uitgebreide reeks genetische eindpunten. De testen leveren informatie over puntmutaties in complexere organismen dan de in het onderzoek voor het basisdossier gebruikte bacteriën en geven uitgebreidere informatie over de mogelijkheden die een stof heeft om chromosoomafwijkingen te induceren.

Testen om andere genetische eindpunten dan puntmutaties en chromosoomafwijkingen na te gaan, worden ook beschreven. Deze leveren aanvullende informatie en kunnen, waar dat van toepassing is, in onderzoekprogramma's worden toegepast.

Als algemeen principe geldt dat een programma voor uitvoeriger mutageniteitsonderzoek zó moet worden ontworpen dat het relevante extra informatie verstrekt over potentiële mutagene en/of carcinogene eigenschappen van die stof.

Welke onderzoekingen in een bepaald geval geschikt zijn, hangt af van vele factoren waaronder de chemische en de fysische eigenschappen van de stof, de resultaten van de voorafgaande bacteriële en cytogenetische analyses, de karakteristieken van de stof ten aanzien van metabolisme, de resultaten van andere toxiciteitsonderzoekingen en de bekende toepassingen van de stof. Een strak schema voor de selectie van testen is daarom niet mogelijk wegens de verscheidenheid aan factoren die eventueel in aanmerking moeten worden genomen. Enkele algemene principes kunnen echter een leidraad vormen. Wanneer een test in het onderzoek voor het basisdossier positief was, dient het aanvullende onderzoek ten minste één test te bevatten waarmee hetzelfde genetische eindpunt kan worden opgespoord. Indien beide testen in het onderzoek voor het basisdossier negatief waren, moet normaal gezien aanvullend onderzoek naar genmutaties én een onderzoek naar chromosoomafwijkingen worden verricht. Misschien kunnen ook extra gegevens worden verkregen uit de (in het onderstaande opgesomde) indicatortesten. Methoden voor dergelijke onderzoekingen zijn hieronder gegroepeerd op basis van hun belangrijkste genetische eindpunten.

Onderzoekingen om gen (punt) mutaties na te gaan

Om het vermogen van een stof om gen (punt) mutaties te veroorzaken nader te onderzoeken, kan een keuze uit de volgende testen worden gedaan:

a) Onderzoek naar voorwaartse of terugwaartse mutaties met gebruikmaking van eukaryote micro-organismen (Saccharomyces cerevisiae).

b) In vitro onderzoekingen om de voorwaartse mutatie in zoogdiercellen na te gaan.

c) Onderzoek naar geslachtsgebonden recessieve lethaliteit bij Drosophilia melanogaster.

d) In vivo onderzoek van somatische celmutatie: „spottest" bij muizen.

Onderzoekingen om chromosoomafwijkingen na te gaan

Indien nader moet worden onderzocht of een stof chromosoomafwijkingen kan veroorzaken, kan een keuze uit de volgende testen worden gedaan:

a) In vivo cytogenetisch onderzoek bij zoogdieren.

De in vivo metafase-analyse van beenmergcellen dient te worden overwogen indien dit tijdens het voorafgaande onderzoek (onderzoek voor het basisdossier) niet was gedaan. Bovendien kan in vivo de cytogenetica met betrekking tot geslachtscellen worden onderzocht.

b) In vitro cytogenetische onderzoekingen in zoogdiercellen indien deze tijdens het voorafgaande onderzoek niet zijn verricht.

c) Onderzoek naar dominant lethale mutaties bij knaagdieren.

d) Overerfelijke translocatietest bij muizen.

Indicatortests voor effecten op DNA

Er zijn methoden die aanwijzingen geven over enkele effecten op het DNA, maar die geen mutagene activiteit als eindpunt hebben. Deze onderzoekingen kunnen aanvullende informatie opleveren naast die welke aan de hand van mutageniteitsonderzoekingen is verkregen; deze kan nuttig zijn bij de interpretatie van dergelijke onderzoekingen. Indien deze onderzoekingen nodig zijn, kan één van de volgende methoden waarbij eukaryote micro-organismen of zoogdiercellen worden gebruikt, worden toegepast:

a) Mitotische recombinatie bij Saccharomyces cerevisiae.

b) Beschadiging en herstel van DNA — ongeprogrammeerde DNA-synthese — in zoogdiercellen (in vitro).

c) Uitwisseling van zusterchromatiden bij zoogdiercellen (in vitro).

Andere indicatortesten met betrekking tot potentiële carcinogene eigenschappen

Er bestaan celtransformatietesten bij zoogdieren welke het vermogen meten van een stof om morfologische en gedragswijzigingen in de celcultures te induceren waarvan wordt vermoed dat zij met kwaadaardige transformaties in vivo verband houden. Er kan een aantal verschillende celtypes en criteria voor transformatie worden gebruikt.

Beoordeling van het risico van overerfelijke effecten bij zoogdieren

Er bestaan methoden om de door gen (punt) mutaties teweeggebrachte overerfelijke effecten bij hele zoogdieren te meten (bijvoorbeeld de specifieke locustest bij muizen [1]), of om chromosoomafwijkingen na te gaan, bijvoorbeeld de overerfelijke translocatietest bij muizen. Dergelijke methoden kunnen worden gebruikt wanneer het eventuele genetische risico van een stof voor de mens wordt geschat. Aangezien deze testen zeer ingewikkeld zijn en er zeer veel dieren voor nodig zijn, vooral voor de specifieke locustest, moeten er gegronde redenen bestaan om deze onderzoekingen te verrichten.

---

[1] De specifieke locustest bij muizen (die in dit document niet is beschreven) kan worden gebruikt om de geslachtscelmutatie in de eerste generatie na de blootstelling aan een mutagene stof te meten. Genetische veranderingen die leiden tot wijzigingen in genprodukten waardoor zichtbare fenotypen ontstaan, kunnen worden opgespoord en gemeten.

SUBCHRONISCHE ORALE TOXICITEITSTEST

90 DAGEN-TEST MET HERHAALDE ORALE TOEDIENING AAN KNAAGDIERSOORTEN

1. METHODE

1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. Definities

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. Referentiestoffen

Geen.

1.4. Principe van de onderzoekmethode

De teststof wordt gedurende een periode van 90 dagen dagelijks in geleidelijk stijgende doseringen aan verscheidene groepen proefdieren oraal toegediend. Er wordt een dosis per groep gebruikt. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks op tekenen van toxiciteit onderzocht. Op de dieren die tijdens het onderzoek sterven en die welke aan het eind van de proefnemingen nog in leven zijn, wordt necropsie verricht.

1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

Voorbereidingen

Voor het onderzoek worden de dieren ten minste vijf dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Voor het onderzoek worden gezonde, jonge dieren op willekeurige wijze in de te behandelen en controlegroepen ingedeeld.

De teststof kan met de voeding, via een maagsonde, in capsules of met het drinkwater worden toegediend. De teststof moet bovendien bij alle dieren voor de gehele duur van het experiment op dezelfde manier worden toegediend. Indien een medium of andere additieven worden gebruikt om de dosering te vergemakkelijken, moet ervan bekend zijn dat zij geen toxische effecten veroorzaken. Eventueel kan gebruik worden gemaakt van bestaande gegevens.

Proefomstandigheden

Proefdieren

Tenzij er contra-indicaties zijn, wordt de voorkeur gegeven aan ratten. Er dient gebruik te worden gemaakt van stammen van jonge, gezonde dieren die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt. Idealiter moet met de dosering worden begonnen voor de ratten zes weken oud zijn; zij mogen in ieder geval niet ouder zijn dan acht weken. Bij het begin van het onderzoek mag het gewicht van de dieren die bij de proeven worden gebruikt, niet meer dan ± 20 % van het gemiddelde gewicht afwijken. Indien een studie naar de subchronische orale toxiciteit wordt verricht ter voorbereiding op een chronisch onderzoek, dienen in beide studies dezelfde soort en stam te worden gebruikt.

Aantal en geslacht

Voor ieder dosisniveau moeten ten minste twintig dieren (tien wijfjes en tien mannetjes) worden gebruikt. De wijfjes moeten nulliparae zijn en mogen niet drachtig zijn. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal worden verhoogd met het aantal dieren dat volgens plan voor de voltooiing van de studie zal worden gedood. Daarnaast kan een satellietgroep van twintig dieren (10 per geslacht) gedurende 90 dagen met het hoge dosisniveau worden behandeld en nog gedurende 28 dagen na de behandeling worden geobserveerd om na te gaan of de toxische effecten eventueel verdwijnen, voortduren of vertraagd tot uiting komen.

Dosisniveaus

Er zijn ten minste drie dosisniveaus en een controle vereist. Afgezien van de toediening van de teststof, moeten de dieren in de controlegroep op dezelfde wijze worden behandeld als de dieren in de proefgroep. Indien ter vergemakkelijking van de dosering gebruik wordt gemaakt van een medium, moet aan de dieren in de controlegroep het medium op dezelfde wijze worden toegediend als aan de dieren in de behandelde groepen en moet deze dosis even groot zijn als die van de dieren in de groep met het hoogste dosisniveau. Het hoogste dosisniveau moet leiden tot toxische effecten, maar er mogen geen of weinig sterfgevallen voorkomen. Bij het laagste dosisniveau mogen geen tekenen van toxiciteit optreden. Wanneer er een bruikbare schatting van de menselijke blootstelling bestaat, moet het laagste niveau deze overschrijden. In het ideale geval treden bij het middelste dosisniveau nauwelijks waarneembare toxische effecten op. Bij meer dan één tussendosis moet het verschil tussen de dosisniveaus zo groot zijn dat een gradatie in toxische effecten wordt verkregen.

In de groep met de geringe dosis en in de tussengroepen, alsmede in de controlegroepen mogen niet veel sterfgevallen voorkomen, omdat anders een zinvolle evaluatie van de resultaten niet mogelijk is.

Indien de teststof met de voeding wordt toegediend, kan een constante voedingsconcentratie (ppm of mg/kg voedsel) of een constant dosisniveau als functie van het lichaamsgewicht van de dieren worden gebruikt; de gekozen methode moet worden gespecificeerd. Wordt de stof via een maagsonde toegediend, dan moet de dosis iedere dag op dezelfde tijd worden toegediend. Op gezette tijden (wekelijks of om de veertien dagen) is een correctie vereist om ervoor te zorgen dat het dosisniveau in verhouding tot het lichaamsgewicht van het dier constant blijft.

Hoogste te testen dosis

Indien bij een onderzoek van 90 dagen, verricht volgens onderstaande methode, bij een dosisniveau van 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag of een hoger niveau, dat is gerelateerd aan het niveau waaraan de mens, voor zover bekend, kan worden blootgesteld, geen toxische effecten optreden, zijn verdere proeven wellicht niet noodzakelijk. Bij stoffen met een lage toxiciteit moet erop worden toegezien dat de hoeveelheden en andere eigenschappen van de teststof bij toediening in het voedsel de normale voedingsvereisten niet verstoren.

Observatieperiode

De proefdieren moeten dagelijks worden gecontroleerd. Tekenen van toxiciteit moeten samen met het tijdstip waarop deze voor het eerst zijn opgetreden, de mate en de duur ervan, worden genoteerd. Het tijdstip waarop de dood intreedt, het tijdstip waarop de toxiciteitsverschijnselen zich voor het eerst voordoen en het tijdstip waarop zij weer verdwijnen, moeten eveneens worden vastgelegd.

Uitvoering

De dieren krijgen in het ideale geval gedurende een periode van 90 dagen, zeven dagen per week, een dosis van de teststof toegediend. Dieren in satellietgroepen voor latere waarnemingen moeten nog 28 dagen onbehandeld blijven om herstel of voortduren van de toxische effecten te kunnen vaststellen.

Bij het observeren van de dieren in de kooien moet aandacht worden besteed aan veranderingen in huid en vacht, ogen en slijmvliezen, ademhaling, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag. Het verbruik van voer (en van water indien de teststof met het drinkwater wordt toegediend) moet wekelijks worden gemeten; de dieren moeten iedere week worden gewogen.

De dieren moeten regelmatig worden geobserveerd om te voorkomen dat zij voor de studie verloren gaan als gevolg van oorzaken als kannibalisme, autolyse van weefsels of verkeerde huisvesting. Na afloop van de onderzoekperiode wordt op alle overlevende dieren van de behandelde groepen, afgezien van die in de satellietgroepen, necropsie verricht. Indien stervende dieren worden aangetroffen, moeten zij worden verwijderd; ook op hen wordt necropsie verricht.

Bij alle dieren, met inbegrip van die uit de controlegroep, worden gewoonlijk de volgende onderzoekingen verricht:

a) Voor de toediening van de teststof en na afloop van het onderzoek dient bij voorkeur bij alle dieren, maar ten minste bij de groep met de hoge dosis en de controlegroep oogonderzoek met behulp van een oogspiegel of een ander voor dit doel geschikt instrument plaats te vinden. Indien er veranderingen in de ogen worden geconstateerd, moeten alle dieren worden onderzocht.

b) Aan het eind van de onderzoekperiode vindt een hematologisch onderzoek plaats, dat onder meer omvat: bepaling van de hematocriet en het hemoglobinegehalte, telling van de erytrocyten, totaaltelling en gedifferentieerde telling van de leukocyten alsmede meting van de stollingseigenschappen zoals stollingstijd, protrombinetijd en tromboplastinetijd, of telling van de bloedplaatjes.

c) Aan het eind van de onderzoekperiode dienen klinisch-biochemische en biochemische bepalingen op het bloed te worden verricht. Voor alle studies in aanmerking komende testen zijn: elektrolytenbalans, koolhydraatstofwisseling, alsmede de lever- en nierfunctie. De selectie van specifieke tests is afhankelijk van de waarnemingen

met betrekking tot het werkingsmechanisme van de stof. Het onderzoek is eventueel uit te breiden met metingen van: calcium, fosfor, chloride, natrium, kalium, nuchter glucosegehalte (met een aan de diersoort aangepaste periode van vasten), serumglutamaatpyruvaattransaminase (1), serumglutamaatoxaalacetaattransaminase (2), ornithinedecarboxylase, gamma-glutamyltranspeptidase, ureumstikstof, albumine, bloedcreatinine, totaal bilirubine en totaal serumproteïne. Voor een goede toxicologische evaluatie kan de bepaling van de lipiden, hormonen, zuur/base-evenwicht, methemoglobine en cholinesterase-activiteit noodzakelijk zijn. Om het onderzoek van de waargenomen effecten uit te breiden kan zo nodig verder klinisch-biochemisch onderzoek worden verricht.

d) Routinematig urineonderzoek is alleen vereist wanneer daartoe op grond van de verwachte of waargenomen toxiciteit een indicatie bestaat.

In het geval van ontoereikende basisgegevens uit het verleden dient de bepaling van hematologische en klinisch-biochemische parameters voordat met de toediening wordt begonnen, aandacht te krijgen.

Macroscopische necropsie

Op alle dieren moet een volledige macroscopische necropsie worden verricht, waarbij het uitwendige lichaamsoppervlak, alle lichaamsopeningen, alsmede de schedel-, borst- en buikholte en hun inhoud worden onderzocht. De lever, nieren, bijnieren en testes moeten nat worden gewogen zo spoedig mogelijk na de sectie om uitdroging te voorkomen. De volgende organen en weefsels moeten in een geschikt medium worden bewaard voor eventueel later histopathologisch onderzoek: alle organen die met het blote oog zichtbare letsels vertonen, hersenen — inclusief delen van medulla/pons, cortex cerebelli en cortex cerebri, hypofyse, schildklier/bijschildklieren, thymusweefsel, luchtpijp en longen, hart, aorta, (speekselklieren), lever, milt, nieren, bijnieren, alvleesklier, geslachtsklieren, uterus, (secundaire geslachtsorganen), (huid), slokdarm, maag, duodenum, jejunum, ileum, blinde darm, colon, rectum, urineblaas, representatieve lymfklieren, (vrouwelijke borstklier), (dijbeenspieren), perifere zenuwen, borstbeen met beenmerg, (ogen), (dijbeen — inclusief gewrichtsvlak), (ruggemerg op drie plaatsen — cervicaal, mediothoracaal en lumbaal) en (traanklieren). De tussen haakjes vermelde weefsels hoeven alleen te worden onderzocht als daarvoor aanwijzingen zijn vanwege toxicologische waarnemingen of als het orgaan is aangetast.

Histopathologisch onderzoek

a) Op de organen en weefsels van de dieren in de controlegroep en de dieren in de groep die de hoogste dosis hebben ontvangen moet een volledig histopathologisch onderzoek worden verricht.

b) Alle met het blote oog zichtbare letsels moeten worden onderzocht.

c) De aangetaste organen van dieren in andere dosisgroepen dienen te worden onderzocht.

d) De longen van de dieren in de groep die een lage dosis heeft ontvangen en van die in de tussengroep dienen histopathologisch te worden onderzocht op tekenen van infectie, aangezien op deze manier een goed beeld van de gezondheidstoestand van de dieren wordt verkregen. Ook de lever en de nieren dienen bij deze groepen histopathologisch te worden onderzocht. Verder routinematig histopathologisch onderzoek is bij de dieren in deze groepen niet vereist, maar moet steeds worden verricht op de organen die in de groep die een hoge dosis heeft ontvangen, letsels bleken te vertonen.

e) Wordt van een satellietgroep gebruik gemaakt, dan moet histopathologisch onderzoek worden verricht op de weefsels en organen waar bij de behandelde groepen effecten blijken te zijn opgetreden.

2. GEGEVENS

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

De resultaten moeten met behulp van een voor dit doel geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

3. VERSLAGGEVING

3.1. Verslag van de proefnemingen

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

— diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voer, enzovoort;

— proefomstandigheden;

— dosisniveaus (met het eventuele medium) en concentraties;

— gegevens over de toxische reactie naar geslacht en dosis;

(1) Thans bekend als serumalanineaminotransferase.
(2) Thans bekend als serumaspartaataminotransferase.

— waar mogelijk, het dosisniveau waarop geen effect is waargenomen;

— tijdstip gedurende de studie waarop de dood intreedt of aangeven of dieren tot het einde van de proef in leven bleven;

— beschrijving van toxische of andere effecten;

— tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en verloop hiervan;

— gegevens over voer en lichaamsgewicht;

— oftalmologische bevindingen;

— uitgevoerd hematologisch onderzoek en alle resultaten;

— uitgevoerd klinisch-biochemisch onderzoek en alle resultaten (resultaten van het urineonderzoek inbegrepen);

— bevindingen van de necropsie;

— gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;

— waar toepasselijk, statistische verwerking van de resultaten;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. **LITERATUUR**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

SUBCHRONISCHE ORALE TOXICITEITSTEST

90 DAGEN-TEST MET HERHAALDE ORALE TOEDIENING AAN NIET-KNAAGDIERSOORTEN

1. METHODE

1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. Definities

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. Referentiestoffen

Geen.

1.4. Principe van de onderzoekmethode

De teststof wordt gedurende een periode van 90 dagen dagelijks in geleidelijk stijgende doseringen aan verscheidene groepen proefdieren oraal toegediend. Er wordt een dosis per groep gebruikt. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks op tekenen van toxiciteit onderzocht. Op de dieren die tijdens het onderzoek sterven en die welke aan het eind van de proefnemingen nog in leven zijn, wordt necropsie verricht.

1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

Voorbereidingen

Voor het onderzoek worden de dieren ten minste vijf dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Voor het onderzoek worden gezonde, jonge dieren op willekeurige wijze in de te behandelen en controlegroepen ingedeeld.

De teststof kan met de voeding worden toegediend, tenzij toediening in capsules de voorkeur blijkt te hebben. Ook andere wijzen van orale toediening komen in aanmerking. De teststof moet bij alle dieren voor de gehele duur van het experiment op dezelfde manier worden toegediend. Indien een medium of andere additieven worden gebruikt om de dosering te vergemakkelijken, moet ervan bekend zijn dat zij geen toxische effecten veroorzaken. Eventueel kan gebruik worden gemaakt van bestaande gegevens.

Proefomstandigheden

Proefdieren

De gewoonlijk gebruikte diersoort is in dit geval de hond, bij voorkeur van een gespecificeerd ras. Ook andere niet-knaagdiersoorten komen in aanmerking. Er dient gebruik te worden gemaakt van jonge, gezonde dieren en in het geval van de hond moet met de dosering bij voorkeur worden begonnen wanneer de dieren tussen vier en zes maanden oud zijn en in ieder geval niet ouder dan negen maanden. Indien een studie naar de subchronische orale toxiciteit wordt verricht ter voorbereiding op een chronisch onderzoek, dienen in beide studies dezelfde soort en hetzelfde ras te worden gebruikt.

Aantal en geslacht

Voor ieder dosisniveau moeten ten minste acht dieren (vier wijfjes en vier mannetjes) worden gebruikt. Voor een zinvolle evaluatie van de toxische effecten moet aan het einde van het onderzoek nog een voldoende aantal dieren in leven zijn.

Dosisniveaus

Er zijn ten minste drie dosisniveaus en een controle vereist. Afgezien van de toediening van de teststof, moeten de dieren in de controlegroep op dezelfde wijze worden behandeld als de dieren in de proefgroep. Het hoogste dosisniveau moet leiden tot toxische effecten, maar er mogen geen sterfgevallen voorkomen. Bij het laagste

dosisniveau mogen geen tekenen van toxiciteit optreden. Wanneer er een bruikbare schatting van de menselijke blootstelling bestaat, moet het laagste niveau deze overschrijden. In het ideale geval treden bij het middelste dosisniveau nauwelijks waarneembare toxische effecten op. Bij meer dan één tussendosis moet het verschil tussen de dosisniveaus zo groot zijn dat een gradatie in toxische effecten wordt verkregen.

In de groep met de geringe dosis en in de tussengroepen, evenmin als in de controlegroepen mogen sterfgevallen voorkomen.

Bij stoffen met een lage toxiciteit moet erop worden toegezien dat de hoeveelheden van de teststof bij toediening in het voedsel de normale voedingsvereisten niet verstoren.

Indien de teststof met de voeding wordt toegediend, kan een constante voedingsconcentratie (ppm of mg/kg voedsel) of een constant dosisniveau als functie van het lichaamsgewicht van de dieren worden gebruikt; de gekozen methode moet worden gespecificeerd. Wordt de dosis rechtstreeks toegediend, bijvoorbeeld in capsules, dan moet de dosis iedere dag op dezelfde tijd worden toegediend; zo nodig is een wekelijkse correctie vereist om ervoor te zorgen dat het dosisniveau in verhouding tot het lichaamsgewicht van het dier constant blijft. Indien een studie naar de subchronische toxiciteit wordt verricht ter voorbereiding op een chronisch onderzoek, dient in beide studies doorgaans hetzelfde dieet te worden gebruikt.

Hoogste te testen dosis

Indien bij een onderzoek van 90 dagen, verricht volgens onderstaande methode, bij een dosisniveau van 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag of een hoger niveau, dat is gerelateerd aan het niveau waaraan de mens, voor zover bekend, kan worden blootgesteld, geen toxische effecten optreden, zijn verdere proeven wellicht niet noodzakelijk. Bij stoffen met een lage toxiciteit moet erop worden toegezien dat de hoeveelheden en andere eigenschappen van de teststof bij toediening in het voedsel de normale voedingsvereisten niet verstoren.

Observatieperiode

De proefdieren moeten dagelijks worden gecontroleerd. Tekenen van toxiciteit moeten samen met het tijdstip waarop deze voor het eerst zijn opgetreden, de mate en de duur ervan worden genoteerd. Het tijdstip waarop de dood intreedt, het tijdstip waarop de toxiciteitsverschijnselen zich voor het eerst voordoen en het tijdstip waarop zij weer verdwijnen, moeten eveneens worden vastgelegd.

Uitvoering

De dieren krijgen in het ideale geval gedurende een periode van 90 dagen, zeven dagen per week, een dosis van de teststof toegediend. Uit praktische overwegingen echter wordt dosering gedurende vijf dagen per week aanvaardbaar geacht, wanneer de stof op andere wijze dan in het voedsel wordt toegediend. Bij het observeren van de dieren moet onder meer aandacht worden besteed aan veranderingen in huid en vacht, ogen en slijmvliezen, ademhaling, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag. Het verbruik van voer (en van water indien de teststof met het drinkwater wordt toegediend) moet wekelijks worden gemeten; de dieren moeten iedere week worden gewogen.

De dieren moeten dagelijks aan een zorgvuldig klinisch onderzoek worden onderworpen, terwijl tevens de vereiste maatregelen moeten worden genomen om ervoor te zorgen dat zo weinig mogelijk dieren voor de studie verloren gaan. Na afloop van de blootstellingsperiode wordt op alle overlevende dieren necropsie verricht. Indien stervende dieren worden aangetroffen, moeten zij worden verwijderd; ook op hen wordt necropsie verricht. Bij alle dieren, met inbegrip van die uit de controlegroep, worden gewoonlijk de volgende onderzoekingen verricht:

a) Voor de toediening van de teststof en na afloop van het onderzoek dient bij voorkeur bij alle dieren, maar ten minste bij de groep met de hoge dosis en de controlegroep oogonderzoek met behulp van een oogspiegel of een ander voor dit doel geschikt instrument plaats te vinden. Indien er veranderingen in de ogen worden geconstateerd, moeten alle dieren worden onderzocht.

b) Bij het begin, vervolgens maandelijks of halverwege het onderzoek, en ten slotte aan het einde van de onderzoekperiode vindt een hematologisch onderzoek plaats, dat onder meer omvat: bepaling van de hematocriet en het hemoglobinegehalte, telling van de erytrocyten, totaaltelling en gedifferentieerde telling van de leukocyten, alsmede meting van de stollingseigenschappen zoals stollingstijd, protrombinetijd en tromboplastinetijd, of telling van de bloedplaatjes.

c) Bij het begin, vervolgens maandelijks of halverwege het onderzoek, en ten slotte aan het einde van de onderzoekperiode dienen klinisch-biochemische bepalingen op het bloed te worden verricht. Voor alle studies in aanmerking komende testen zijn: elektrolytenbalans, koolhydraatstofwisseling, alsmede de lever- en nierfunctie. De selectie van specifieke testen is afhankelijk van de waarnemingen met betrekking tot het werkingsmechanisme van de teststof. Het onderzoek is eventueel uit te breiden met metingen van: calcium, fosfor, chloride, natrium, kalium, nuchter glucosegehalte (met een aan de diersoort of het ras aangepaste periode van vasten), serumglutamaatpyruvaattransaminase (1), serumglutamaatoxaalacetaattransaminase (2), ornithinedecarboxylase, gammaglutamyltranspeptidase, ureumstikstof, albumine, bloedcreatinine,

(1) Thans bekend als serumalanineaminotransferase.
(2) Thans bekend als serumaspartaataminotransferase.

totaal bilirubine en totaal serumproteïne. Voor een goede toxicologische evaluatie kan de bepaling van de lipiden, hormonen, zuur/base-evenwicht, methemoglobine en cholinesteraseremming noodzakelijk zijn. Om het onderzoek van de waargenomen effecten uit te breiden, kan zo nodig verder klinisch-biochemisch onderzoek worden verricht. Niet-knaagdieren dienen voor het afnemen van bloed nuchter te zijn (niet langer dan 24 uur vasten).

d) Routinematig urineonderzoek is alleen vereist wanneer daartoe op grond van de verwachte of waargenomen toxiciteit een indicatie bestaat.

Macroscopische necropsie

Op alle dieren moet een volledige macroscopische necropsie worden verricht, waarbij het uitwendige lichaamsoppervlak, alle lichaamsopeningen, alsmede de schedel-, borst- en buikholte en hun inhoud worden onderzocht. De lever, nieren, bijnieren, schildklier (met bijschildklieren) en testes moeten zo spoedig mogelijk na de sectie nat worden gewogen om uitdroging te voorkomen.

De volgende organen en weefsels moeten in een geschikt medium worden bewaard voor eventueel later histopathologisch onderzoek: alle organen die met het blote oog zichtbare letsels vertonen, hersenen — inclusief delen van medulla/pons, cortex cerebelli en cortex cerebri, hypofyse, schildklier/bijschildklieren, thymusweefsel, (luchtpijp), longen, hart, aorta, speekselklieren, lever, milt, nieren, bijnieren, alvleesklier, geslachtsklieren, uterus, (secundaire geslachtsorganen), (huid), galblaas, slokdarm, maag, duodenum, jejunum, ileum, blinde darm, colon, rectum, urineblaas, representatieve lymfklieren, (vrouwelijke borstklier), (dijbeenspieren), perifere zenuwen, (ogen), borstbeen met beenmerg, (dijbeen — inclusief gewrichtsvlak) en (ruggemerg op drie plaatsen — cervicaal, mediothoracaal en lumbaal). (De tussen haakjes vermelde weefsels hoeven alleen te worden onderzocht als daarvoor aanwijzingen zijn vanwege toxicologische waarnemingen of als het orgaan is aangetast.)

Histopathologisch onderzoek

Op de organen en weefsels van de dieren in de controlegroep en de dieren in de groep die de hoogste dosis heeft ontvangen, moet een volledig histopathologisch onderzoek worden verricht. Verder histopathologisch onderzoek bij andere dosisgroepen dient te worden uitgevoerd op organen die in de groep die een hoge dosis heeft ontvangen, letsels vertonen of waarvoor een dergelijk onderzoek op grond van klinische waarnemingen is geïndiceerd.

2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het aantal dieren dat letsels vertoont, de aard van de letsels en het percentage dieren waarbij ieder type letsel voorkomt. De resultaten moeten met behulp van een voor dit doel geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

3. VERSLAGGEVING

3.1. Verslag van de proefnemingen

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

— diersoort, ras of stam, herkomst, leefomstandigheden, voer, enzovoort;

— proefomstandigheden;

— dosisniveaus (met het eventuele medium) en concentraties;

— gegevens over de toxische reactie naar geslacht en dosis;

— waar mogelijk, het dosisniveau waarop geen effect is waargenomen;

— tijdstip gedurende de studie waarop de dood intreedt of aangeven of dieren tot het einde van de proef in leven bleven;

— beschrijving van toxische of andere effecten (met bijzondere aandacht voor de klinische bevindingen);

— tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en verloop hiervan;

— gegevens over voer en lichaamsgewicht;

— oftalmologische bevindingen;

— uitgevoerd hematologisch onderzoek en alle resultaten;

— uitgevoerd klinisch-biochemisch onderzoek en alle resultaten (resultaten van het urineonderzoek inbegrepen);

— bevindingen van de necropsie;

— gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;

— waar toepasselijk, statistische verwerking van de resultaten;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evalutie en interpretatie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. **LITERATUUR**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

SUBCHRONISCHE DERMALE TOXICITEITSTEST

90 DAGEN-TEST MET HERHAALDE DERMALE TOEDIENING AAN KNAAGDIERSOORTEN

1. METHODE

1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. Definities

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. Referentiestoffen

Geen.

1.4. Principe van de onderzoekmethode

De teststof wordt gedurende een periode van 90 dagen dagelijks in geleidelijk stijgende doseringen bij verscheidene groepen proefdieren op de huid aangebracht. Er wordt een dosis per groep gebruikt. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks op tekenen van toxiciteit onderzocht. Op de dieren die tijdens het onderzoek sterven en die welke aan het eind van de proefnemingen nog in leven zijn, wordt necropsie verricht.

1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

Voorbereidingen

Voor het onderzoek worden de dieren ten minste vijf dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Voor het onderzoek worden gezonde, jonge dieren op willekeurige wijze in de te behandelen groepen en controlegroepen ingedeeld. Kort voor de proefneming wordt het haar op het ruggedeelte van de romp van de proefdieren geknipt. Het dier kan ook worden geschoren, maar dit moet dan ongeveer 24 uur voor de proef worden uitgevoerd. Gewoonlijk zal het dier ongeveer om de week opnieuw moeten worden geknipt of geschoren. Bij het knippen of scheren van de vacht moet erop worden gelet dat de huid niet wordt beschadigd. Ten minste 10 % van de lichaamsoppervlakte moet voor de aanbrenging van de teststof worden onthaard. Bij het bepalen van de oppervlakte die moet worden onthaard, en de afmetingen van het verband moet rekening worden gehouden met het gewicht van het dier. Bij proefnemingen met vaste stoffen, die eventueel tot poeder kunnen worden fijngemalen, moet de teststof voldoende met water of, zo nodig, met een passend medium worden bevochtigd, zodat de stof goed in contact met de huid komt. Vloeibare teststoffen worden in het algemeen onverdund gebruikt. De teststof wordt gedurende vijf tot zeven dagen per week dagelijks aangebracht.

Proefomstandigheden

Proefdieren

Er kan gebruik worden gemaakt van volwassen ratten, konijnen of cavia's. Ook andere diersoorten kunnen worden gebruikt, maar de noodzaak hiervan moet worden aangetoond. Bij het begin van het onderzoek mag het gewicht van de dieren niet meer dan ± 20 % van het gemiddelde gewicht afwijken.

Indien een studie naar de subchronische dermale toxiciteit wordt verricht ter voorbereiding op een chronisch onderzoek, dienen in beide studies dezelfde soort en stam te worden gebruikt.

Aantal en geslacht

Voor ieder dosisniveau moeten ten minste twintig dieren (tien wijfjes en tien mannetjes) met een gezonde huid worden gebruikt. De vrouwtjes moeten nulliparae zijn en mogen niet drachtig zijn. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal worden verhoogd met het aantal dieren dat volgens plan voor de voltooiing van de studie zal worden gedood. Daarnaast kan een satellietgroep van twintig dieren (tien per geslacht) gedurende 90 dagen met het hoge dosisniveau worden behandeld en nog gedurende 28 dagen na de behandeling worden geobserveerd om na te gaan of de toxische effecten eventueel verdwijnen, voortduren of vertraagd tot uiting komen.

Dosisniveaus

Er zijn ten minste drie dosisniveaus vereist, met een controle of een mediumcontrole indien een medium wordt gebruikt. De blootstellingsduur dient ten minste zes uur per dag te bedragen. De teststof moet iedere dag op dezelfde tijd worden toegediend; op gezette tijden (iedere week of om de veertien dagen) is een correctie vereist om ervoor te zorgen dat het dosisniveau in verhouding tot het lichaamsgewicht van het dier constant blijft. Afgezien van de toediening van de teststof, moeten de dieren in de controlegroep op dezelfde wijze worden behandeld als de dieren in de proefgroep. Indien ter vergemakkelijking van de dosering gebruik wordt gemaakt van een medium, moet aan de dieren in de mediumcontrolegroep de dosis op dezelfde wijze worden toegediend als aan de dieren in de behandelde groepen en moet deze dosis even groot zijn als die van de dieren in de groep met het hoogste dosisniveau. Het hoogste dosisniveau moet leiden tot toxische effecten, maar er mogen geen of weinig sterfgevallen voorkomen. Bij het laagste dosisniveau mogen geen tekenen van toxiciteit optreden. Wanneer er een bruikbare schatting van de menselijke blootstelling bestaat, moet het laagste niveau deze overschrijden. In het ideale geval treden bij het middelste dosisniveau nauwelijks waarneembare toxische effecten op. Bij meer dan één tussendosis moet het verschil tussen de dosisniveaus zo groot zijn dat een gradatie in toxische effecten wordt verkregen. In de groep met de geringe dosis en in de tussengroepen alsmede in de controlegroepen mogen niet veel sterfgevallen voorkomen, omdat anders een zinvolle evaluatie van de resultaten niet mogelijk is.

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

Hoogste te testen dosis

Indien bij een voorafgaand onderzoek bij een dosisniveau van 1 000 mg/kg of een hoger niveau, dat is gerelateerd aan het niveau waaraan de mens, voor zover bekend, kan worden blootgesteld, geen toxische effecten optreden, zijn verdere proeven wellicht niet noodzakelijk.

Observatieperiode

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

Uitvoering

De dieren moeten apart in kooien worden ondergebracht. De dieren worden in het ideale geval gedurende een periode van 90 dagen, zeven dagen per week, met de teststof behandeld.

Dieren in satellietgroepen voor latere waarnemingen moeten nog 28 dagen onbehandeld blijven om herstel of voortduren van de toxische effecten te kunnen vaststellen. De blootstellingsduur moet zes uur per dag bedragen.

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

De teststof moet voor de duur van de blootstelling door middel van poreus verbandgaas en niet-irriterend plakband in contact met de huid blijven. Dit gedeelte van de huid moet op een geschikte wijze nog verder worden bedekt om het verbandgaas en de teststof op hun plaats te houden en om te verhinderen dat de dieren de teststof oraal opnemen. Om dit te voorkomen kunnen hulpmiddelen worden gebruikt waarmee de dieren in hun bewegingsvrijheid worden belemmerd, maar het is niet aan te bevelen de bewegingsvrijheid van de dieren volledig te beperken.

Aan het eind van de blootstellingsperiode wordt de resterende teststof waar mogelijk met water van de huid verwijderd of anders door middel van een andere geschikte schoonmaakmethode.

Alle dieren moeten dagelijks worden gecontroleerd; tekenen van toxiciteit moeten samen met het tijdstip waarop deze voor het eerst zijn opgetreden, de mate en de duur ervan worden genoteerd. Bij het observeren van de dieren in de kooien moet aandacht worden besteed aan veranderingen in huid en vacht, ogen en slijmvliezen, ademhaling, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag. Het verbruik van voer moet wekelijks worden gemeten en de dieren moeten iedere week worden gewogen. De dieren moeten regelmatig worden geobserveerd om te voorkomen dat zij voor de studie verloren gaan als gevolg van oorzaken als kannibalisme, autolyse van weefsels of verkeerde huisvesting. Na afloop van de onderzoekperiode wordt op alle overlevende dieren van de behandelde groepen, afgezien van die in de satellietgroepen, necropsie verricht. Indien stervende dieren worden aangetroffen, moeten zij worden verwijderd; ook op hen wordt necropsie verricht.

Bij alle dieren, met inbegrip van die uit de controlegroep, worden gewoonlijk de volgende onderzoekingen verricht:

a) Voor de blootstelling aan de teststof en na afloop van het onderzoek dient bij voorkeur bij alle dieren, maar ten minste bij de groep met de hoge dosis en de controlegroep oogonderzoek met behulp van een oogspiegel of een ander voor dit doel geschikt instrument plaats te vinden. Indien er veranderingen in de ogen worden vastgesteld, moeten alle dieren worden onderzocht.

b) Aan het einde van de onderzoekperiode vindt een hematologisch onderzoek plaats, dat onder meer omvat: bepaling van het hematocriet en het hemoglobinegehalte, telling van de erytrocyten, totaaltelling en gedifferentieerde telling van de leukocyten, alsmede meting van de stollingseigenschappen zoals stollingstijd, protrombinetijd en tromboplastinetijd, of telling van de bloedplaatjes.

c) Aan het einde van de onderzoekperiode dienen klinische en biochemische bepalingen op het bloed te worden verricht. Voor alle studies in aanmerking komende testen zijn: elektrolytenbalans, koolhydraatstofwisseling, alsmede de lever- en nierfunctie. De selectie van specifieke testen is afhankelijk van de waarnemingen met betrekking tot het werkingsmechanisme van de stof. Het onderzoek is eventueel uit te breiden met metingen van: calcium, fosfor, chloride, natrium, kalium, nuchter glucosegehalte (met een aan de diersoort aangepaste periode van vasten), serumglutamaatpyruvaattransaminase (1), serumglutamaatoxaalacetaattransaminase (2), ornithinedecarboxylase, gammaglutamyltranspeptidase, ureumstikstof, albumine, bloedcreatinine, totaal bilirubine en totaal serumproteïne.

Voor een goede toxicologische evaluatie kan de bepaling van de lipiden, hormonen, zuur/base-evenwicht, methemoglobine en cholinesterase-activiteit noodzakelijk zijn. Om het onderzoek van de waargenomen effecten uit te breiden kan zo nodig verder klinisch-biochemisch onderzoek worden verricht.

d) Routinematig urineonderzoek is alleen vereist wanneer daartoe op grond van de verwachte of waargenomen toxiciteit een indicatie bestaat.

In het geval van ontoereikende basisgegevens uit het verleden dient de bepaling van hematologische en klinisch-biochemische parameters voordat met de dosering wordt begonnen aandacht te krijgen.

Macroscopische necropsie

Op alle dieren moet een volledige macroscopische necropsie worden verricht, waarbij het uitwendige lichaamsoppervlak, alle lichaamsopeningen, alsmede de schedel-, borst- en buikholte en hun inhoud worden onderzocht. De lever, nieren, bijnieren en testes moeten zo spoedig mogelijk na de sectie nat worden gewogen om uitdroging te voorkomen. De volgende organen en weefsels moeten in een geschikt medium worden bewaard voor eventueel later histopathologisch onderzoek: alle organen die met het blote oog zichtbare letsels vertonen, hersenen — inclusief delen van medulla/pons, cortex cerebelli en cortex cerebri, hypofyse, schildklier/bijschildklieren, thymusweefsel, (luchtpijp), longen, hart, aorta, speekselklieren, lever, milt, nieren, bijnieren, alvleesklier, geslachtsklieren, secundaire geslachtsorganen, galblaas (indien aanwezig), slokdarm, maag, duodenum, jejunum, ileum, blinde darm, colon, rectum, urineblaas, representatieve lymfklieren, (vrouwelijke borstklier), (dijbeenspieren), perifere zenuwen, (ogen), (borstbeen met beenmerg), (dijbeen — inclusief gewrichtsvlak), (ruggemerg op drie plaatsen — cervicaal, mediothoracaal en lumbaal) en (traanklieren). (De tussen haakjes vermelde weefsels hoeven alleen te worden onderzocht als daarvoor aanwijzingen zijn vanwege toxicologische waarnemingen of als het orgaan is aangetast.)

Histopathologisch onderzoek

a) Op de normale en behandelde huid en de organen en weefsels van alle dieren in de controlegroep en in de groep die de hoogste dosis heeft ontvangen, moet een volledig histopathologisch onderzoek worden verricht.

b) Alle met het blote oog zichtbare letsels moeten worden onderzocht.

c) De aangetaste organen dienen in dieren in andere dosisgroepen te worden onderzocht.

d) Bij gebruikmaking van ratten dienen de longen van de dieren in de groep die een lage dosis heeft ontvangen en van die in de tussengroep histopathologisch te worden onderzocht op tekenen van infectie, aangezien op deze manier een goed beeld van de gezondheidstoestand van de dieren wordt verkregen. Verder routinematig histopathologisch onderzoek is bij de dieren in deze groepen niet vereist, maar moet steeds worden verricht op de organen die in de groep die een hoge dosis heeft ontvangen, letsels bleken te vertonen.

e) Wordt van een satellietgroep gebruik gemaakt, dan moet histopathologisch onderzoek worden verricht op de weefsels en organen waar bij andere behandelde groepen effecten blijken te zijn opgetreden.

2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het aantal dieren dat letsels vertoont, de aard van de letsels en het percentage dieren waarbij ieder type letsel voorkomt. De resultaten moeten met behulp van een voor dit doel geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

(1) Thans bekend als serumalanineaminotransferase.
(2) Thans bekend als serumaspartaataminotransferase.

3. VERSLAGGEVING

3.1. **Verslag van de proefnemingen**

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

— diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voer, enzovoort;

— proefomstandigheden;

— dosisniveaus (met het eventuele medium) en concentraties;

— waar mogelijk, het dosisniveau waarop geen effect is waargenomen;

— gegevens over de toxische reactie naar geslacht en dosis;

— tijdstip gedurende de studie waarop de dood intreedt of aangeven of dieren tot het einde van de proef in leven bleven;

— beschrijving van toxische of andere effecten;

— tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en verloop hiervan;

— gegevens over voer en lichaamsgewicht;

— oftalmologische bevindingen;

— uitgevoerd hematologisch onderzoek en resultaten;

— uitgevoerd klinisch-biochemisch onderzoek en resultaten (resultaten van het urineonderzoek inbegrepen);

— bevindingen van de necropsie;

— gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;

— waar toepasselijk, statistische verwerking van de resultaten;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. LITERATUUR

Zie Algemene inleiding — Deel B.

SUBCHRONISCHE INHALATIETOXICITEITSTEST

90 DAGEN-TEST MET HERHAALDE INHALATOIRE TOEDIENING AAN KNAAGDIERSOORTEN

1. METHODE

1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. Definities

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. Referentiestoffen

Geen.

1.4. Principe van de onderzoekmethode

Verscheidene groepen proefdieren worden gedurende een periode van 90 dagen dagelijks voor een bepaalde tijd aan geleidelijk stijgende concentraties van de teststof blootgesteld. Er wordt een concentratie per groep gebruikt. Indien een medium wordt gebruikt om de juiste concentratie van de teststof in de atmosfeer te bereiken, moet een mediumcontrolegroep worden gebruikt. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks op tekenen van toxiciteit onderzocht. Op de dieren die tijdens het onderzoek sterven en die welke aan het einde van de proefnemingen nog in leven zijn, wordt necropsie verricht.

1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

Voorbereidingen

Voor het onderzoek worden de dieren ten minste vijf dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Voor het onderzoek worden gezonde, jonge dieren op willekeurige wijze in de te behandelen en controlegroepen ingedeeld. Waar nodig wordt een passend medium aan de teststof toegevoegd, ten einde de juiste concentratie van de teststof in de atmosfeer te bereiken. Indien een medium of andere additieven worden gebruikt om de dosering te vergemakkelijken, moet daarvan bekend zijn dat zij geen toxische effecten veroorzaken. Eventueel kan gebruik worden gemaakt van bestaande gegevens.

Proefomstandigheden

Proefdieren

Tenzij er contra-indicaties zijn, wordt de voorkeur gegeven aan ratten. Er dient gebruik te worden gemaakt van stammen van jonge, gezonde dieren die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt. Bij het begin van het onderzoek mag het gewicht van de dieren die bij de proeven worden gebruikt, niet meer dan ± 20 % van het gemiddelde gewicht afwijken. Indien een studie naar de subchronische inhalatietoxiciteit wordt verricht ter voorbereiding op een langdurig onderzoek, dienen in beide studies dezelfde soort en stam te worden gebruikt.

Aantal en geslacht

Iedere testgroep moet uit ten minste twintig dieren (tien wijfjes en tien mannetjes) bestaan. De vrouwtjes moeten nulliparae zijn en mogen niet drachtig zijn. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal worden verhoogd met het aantal dieren dat volgens plan voor de voltooiing van de studie zal worden gedood. Daarnaast kan een satellietgroep van twintig dieren (tien per geslacht) gedurende 90 dagen met het hoge concentratieniveau worden behandeld en nog gedurende 28 dagen na de behandeling worden geobserveerd om na te gaan of de toxische effecten eventueel verdwijnen, voortduren of vertraagd tot uiting komen.

Blootstellingsconcentraties

Er zijn ten minste drie concentraties vereist, met een controle of een mediumcontrole (overeenkomend met de concentratie van het medium bij het hoogste expositieniveau) indien een medium wordt gebruikt. Afgezien van de toediening van de teststof, moeten de dieren in de controlegroep op dezelfde wijze worden behandeld als de dieren in de behandelde groep. De hoogste concentratie moet leiden tot toxische effecten, maar er mogen geen of weinig sterfgevallen voorkomen. Bij de laagste concentratie mogen geen tekenen van toxiciteit optreden. Wanneer er een bruikbare schatting van de menselijke blootstelling bestaat, moet de laagste concentratie deze overschrijden. In het ideale geval treden bij de middelste concentratie nauwelijks waarneembare toxische effecten op. Bij meer dan één tussenconcentratie moet het verschil tussen de concentraties zo groot zijn dat een gradatie in toxische effecten wordt verkregen. In de groep met de geringe concentratie en in de tussenliggende groepen, alsmede in de controlegroepen mogen niet veel sterfgevallen voorkomen, omdat anders een zinvolle evaluatie van de resultaten niet mogelijk is.

Duur van de blootstelling

De dagelijkse blootstellingsduur bedraagt zes uur nadat in de verschillende kamers de juiste concentratie is bereikt. De blootstellingsduur kan eventueel aan specifieke behoeften worden aangepast.

Apparatuur

De dieren worden aan de teststof blootgesteld met behulp van inhalatieapparatuur die zodanig gebouwd moet zijn dat kan worden gezorgd voor een dynamische luchtdoorstroming van ten minste twaalf luchtverversingen per uur, een toereikend zuurstofgehalte en een gelijkmatige verdeling van de teststof in de atmosfeer. Als van een blootstellingskamer gebruik wordt gemaakt, moet deze op zodanige wijze zijn ontworpen dat de dieren elkaar zo min mogelijk verdringen en zoveel mogelijk door inhalatie aan de teststof worden blootgesteld. Als algemene regel voor het verzekeren van een stabiele atmosfeer in de expositiekamer geldt dat het totale „volume" van de proefdieren niet meer mag bedragen dan 5 % van het volume van de blootstellingskamer. Naar keuze kan de oro-nasale methode worden toegepast, de kop alleen worden blootgesteld of het gehele lichaam in een afzonderlijke ruimte worden blootgesteld; met de eerste twee methoden wordt bereikt dat zo min mogelijk van de teststof via andere wegen in het lichaam wordt opgenomen.

Observatieperiode

De proefdieren moeten tijdens de gehele periode van behandeling en herstel dagelijks op tekenen van toxiciteit worden onderzocht. Het tijdstip waarop de dood intreedt, het tijdstip waarop de toxiciteitsverschijnselen zich voor het eerst voordoen, en het tijdstip waarop zij weer verdwijnen, moeten worden vastgelegd.

Uitvoering

De dieren worden gedurende een periode van 90 dagen vijf tot zeven dagen per week aan de teststof blootgesteld. Dieren in satellietgroepen voor latere waarnemingen moeten nog 28 dagen onbehandeld blijven om herstel of voortduren van de toxische effecten te kunnen vaststellen. Tijdens de proefnemingen dient de temperatuur op 22 °C (± 3 °C) te worden gehouden. In het ideale geval moet de relatieve vochtigheid tussen 30 % en 70 % worden gehouden, behalve waar dit niet mogelijk is (bij voorbeld bij het testen van sommige aërosolen). Gedurende de blootstelling wordt de dieren voedsel en water onthouden.

Er moet gebruik worden gemaakt van een dynamisch inhalatiesysteem met een geschikt systeem voor de analytische controle van de concentratie. Aanbevolen wordt in een verkennende proef vast te stellen welke blootstellingsconcentraties voor de proeven het meest geschikt zijn. Het aantal luchtverversingen per uur moet worden aangepast, zodat in de gehele blootstellingskamer homogene omstandigheden heersen. Het systeem moet waarborgen dat de omstandigheden bij de proef zo spoedig mogelijk stabiel zijn.

De volgende parameters moeten worden gemeten of gecontroleerd:

a) Gedurende de hele proef het aantal luchtverversingen per uur.

b) De feitelijke concentratie van de teststof in de ademhalingsruimte. Tijdens de dagelijkse blootstelling mag de concentratie met niet meer dan ± 15 % van het gemiddelde afwijken. Bij stof- en vloeistofaërosolen is het mogelijk dat de concentraties niet binnen de gestelde grenzen kunnen worden gehouden; in dat geval kan een grotere afwijking aanvaardbaar zijn. Tijdens de gehele duur van de studie moeten de dagelijkse concentraties zo constant mogelijk worden gehouden. Gedurende het werken van de apparatuur voor het genereren van deeltjes moeten analyses worden uitgevoerd van de deeltjesgrootte, ten einde de stabiliteit van het aërosol vast te stellen. Tijdens de blootstelling moet zo dikwijls als dit noodzakelijk is een analyse worden uitgevoerd om de stabiliteitsconsistentie van de verdeling van de deeltjesgrootte te bepalen.

c) Temperatuur en vochtigheid.

d) Tijdens en na de blootstelling worden waarnemingen gedaan die voor elk dier afzonderlijk systematisch worden geregistreerd. Alle dieren moeten dagelijks worden geobserveerd; tekenen van toxiciteit moeten samen met het tijdstip waarop deze voor het eerst zijn opgetreden, de mate en de duur ervan worden vastgelegd. Bij het observeren van de dieren in de kooien wordt in ieder geval aandacht besteed aan veranderingen in huid en vacht, ogen, slijmvliezen, ademhaling, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag. Wekelijks moet het verbruik van voer worden gemeten en moeten de dieren worden gewogen. De dieren moeten regelmatig worden geobserveerd om te vermijden dat ze voor de studie verloren

gaan als gevolg van oorzaken als kannibalisme, autolyse van weefsels of verkeerde huisvesting. Na afloop van de onderzoekperiode wordt op alle overlevende dieren van de behandelde groepen, afgezien van de dieren in de satellietgroep, necropsie verricht. Wanneer stervende dieren worden aangetroffen, moeten zij worden verwijderd; ook op hen wordt necropsie verricht.

Bij alle dieren, met inbegrip van die uit de controlegroep, worden gewoonlijk de volgende onderzoekingen verricht:

a) Voor expositie aan de teststof en na afloop van het onderzoek dient bij voorkeur bij alle dieren, maar ten minste bij de groep met de hoge dosis en de controlegroep oogonderzoek met behulp van een oogspiegel of een ander voor dit doel geschikt instrument plaats te vinden. Indien er veranderingen in de ogen worden vastgesteld, moeten alle dieren worden onderzocht.

b) Aan het einde van de onderzoekperiode vindt een hematologisch onderzoek plaats, dat onder meer omvat: bepaling van het hematocriet en het hemoglobinegehalte, telling van de erytrocyten, totaaltelling en gedifferentieerde telling van de leukocyten, alsmede meting van de stollingseigenschappen zoals stollingstijd, protrombinetijd en tromboplastinetijd, of telling van de bloedplaatjes.

c) Aan het einde van de onderzoekperiode dienen klinische en biochemische bepalingen op het bloed te worden verricht. Voor alle studies in aanmerking komende testen zijn: elektrolytenbalans, koolhydraatstofwisseling, alsmede de lever- en nierfunctie. De selectie van specifieke testen is afhankelijk van de waarnemingen met betrekking tot het werkingsmechanisme van de stof. Het onderzoek is eventueel uit te breiden met metingen van: calcium, fosfor, chloride, natrium, kalium, nuchter glucosegehalte (met een aan de diersoort aangepaste periode van vasten), serumglutamaatpyruvaattransaminase (1), serumglutamaatoxaalacetaattransaminase (2), ornithinedecarboxylase, gammaglutamyltranspeptidase, ureumstikstof, albumine, bloedcreatinine, totaal bilirubine en totaal serumproteïne. Voor een goede toxicologische evaluatie kan de bepaling van de lipiden, hormonen, zuur/base-evenwicht, methemoglobine en cholinesterase-activiteit noodzakelijk zijn. Om het onderzoek van de waargenomen effecten verder uit te breiden, kan zo nodig verder klinisch-biochemisch onderzoek worden verricht.

d) Routinematig urineonderzoek is alleen vereist wanneer daartoe op grond van de verwachte of waargenomen toxiciteit een indicatie bestaat.

In het geval van ontoereikende basisgegevens uit het verleden dient de bepaling van hematologische en klinisch-biochemische parameters voordat met de toediening wordt begonnen aandacht te krijgen.

Macroscopische necropsie

Op alle dieren moet een volledige macroscopische necropsie worden verricht, waarbij het uitwendige lichaamsoppervlak, alle lichaamsopeningen, alsmede de schedel-, borst- en buikholte en hun inhoud worden onderzocht. De lever, nieren, bijnieren en testes moeten zo spoedig mogelijk na de sectie nat worden gewogen om uitdroging te voorkomen. De volgende organen en weefsels moeten in een geschikt medium worden bewaard voor eventueel later histopathologisch onderzoek: alle organen die met het blote oog zichtbare letsels vertonen, longen — die in hun geheel moeten worden verwijderd, gewogen en behandeld met een geschikt fixatief om ervoor te zorgen dat de longstructuur intact blijft (perfusie met een fixatief wordt als een doeltreffende methode beschouwd), weefsels van de nasopharynx, hersenen — inclusief delen van medulla/pons, cortex cerebelli en cortex cerebri, hypofyse, schildklier/bijschildklieren, thymusweefsel, luchtpijp, hart, aorta, speekselklieren, lever, milt, nieren, bijnieren, alvleesklier, geslachtsklieren, uterus, (secundaire geslachtsorganen), (huid), galblaas (indien aanwezig), slokdarm, maag, duodenum, jejunum, ileum, blinde darm, colon, rectum, urineblaas, representatieve lymfklieren, (vrouwelijke borstklier), (dijbeenspieren), perifere zenuwen, (ogen), borstbeen met beenmerg, (dijbeen — inclusief gewrichtsvlak), (ruggemerg op drie plaatsen — cervicaal, mediothoracaal en lumbaal) en (traanklieren). (De tussen haakjes vermelde weefsels hoeven alleen te worden onderzocht als daarvoor aanwijzingen zijn vanwege toxicologische waarnemingen of als het orgaan is aangetast.)

Histopathologisch onderzoek

a) Op de ademhalingswegen en andere organen weefsels van alle dieren in de controlegroep en de groep die de hoogste dosis heeft ontvangen, moet een volledig histopathologisch onderzoek worden verricht.

b) Alle met het blote oog zichtbare letsels moeten worden onderzocht.

c) De aangetaste organen dienen in dieren in andere dosisgroepen te worden onderzocht.

d) De longen van de dieren in de groep die een lage dosis heeft ontvangen, en van die in de tussengroep dienen ook histopathologisch te worden onderzocht, aangezien op deze manier een goed beeld van de gezondheidstoestand van de dieren wordt verkregen. Verder routinematig histopathologisch onderzoek is bij de dieren in deze groepen als vaste regel niet vereist, maar moet steeds worden verricht op de organen die in de groep die een hoge dosis heeft ontvangen, letsels bleken te vertonen.

e) Wordt van een satellietgroep gebruik gemaakt, dan moet histopathologisch onderzoek worden verricht op de weefsels en organen waar bij andere behandelde groepen effecten blijken te zijn opgetreden.

(1) Thans bekend als serumalanineaminotransferase.
(2) Thans bekend als serumaspartaataminotransferase.

2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het aantal dieren dat letsels vertoont, de aard van de letsels en het percentage dieren waarbij ieder type letsel voorkomt. De resultaten moeten met behulp van een voor dit doel geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

3. VERSLAGGEVING

3.1. **Verslag van de proefnemingen**

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

— diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voer, enz.;

— proefomstandigheden:

Beschrijving van de blootstellingsapparatuur: met inbegrip van ontwerp, type, afmetingen, luchtbron, systeem voor het bereiden van stof- en vloeistofaërosolen, methoden voor het conditioneren van de lucht, behandeling van de afgewerkte lucht en wijze waarop de dieren tijdens de proeven in een blootstellingskamer zijn ondergebracht als deze wordt gebruikt. Er moet een beschrijving worden gegeven van de apparatuur voor het meten van de temperatuur, de vochtigheid en, in voorkomend geval, de stabiliteit van de concentratie en de deeltjesgrootte van de aërosolen.

Gegevens betreffende de blootstelling: deze moeten in tabelvorm worden gerangschikt en worden voorzien van gemiddelde waarden en een maat voor de variabiliteit (bij voorbeeld standaarddeviatie). Zij dienen te omvatten:

a) het aantal luchtverversingen per uur in de inhalatieapparatuur;

b) temperatuur en vochtigheid van de lucht;

c) nominale concentraties (de totale hoeveelheid teststof die de inhalatieapparatuur wordt binnengeleid, gedeeld door het luchtvolume);

d) aard van het eventuele medium;

e) feitelijke concentraties van de teststof in de ademhalingsruimte van de dieren;

f) mediaan van de deeltjesgrootte (in voorkomend geval).

— gegevens over de toxische reactie naar geslacht en concentratie;

— waar mogelijk het dosisniveau waarop geen effect is waargenomen;

— tijdstip gedurende de studie waarop de dood intreedt of aangeven of dieren tot het einde van de proef in leven bleven;

— beschrijving van toxische of andere effecten; niveau waarop de concentratie geen effect heeft;

— tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en verloop hiervan;

— gegevens over voer en lichaamsgewicht;

— oftalmologische bevindingen;

— uitgevoerd hematologisch onderzoek en resultaten;

— uitgevoerd klinisch-biochemisch onderzoek en resultaten (resultaten van het urineonderzoek inbegrepen);

— bevindingen van de necropsie;

— gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;

— waar toepasselijk, statistische verwerking van de resultaten;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. LITERATUUR

Zie Algemene inleiding — Deel B.

TERATOGENITEITSONDERZOEK

1. METHODE

1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. Definities

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. Referentiestoffen

Geen.

1.4. Principe van de onderzoekmethode

De teststof wordt in geleidelijk stijgende doseringen of concentraties aan verscheidene groepen drachtige proefdieren toegediend gedurende ten minste dat deel van de dracht waarin de organogenese plaatsvindt. Er wordt een dosis per groep gebruikt. Kort voor de vermoedelijke werpdatum wordt het moederdier gedood, de baarmoeder verwijderd en de inhoud ervan onderzocht. Deze onderzoekmethode heeft betrekking op de embryo- en foetotoxiciteit.

1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

Voorbereidingen

Voor het onderzoek worden gezonde, jonge, volwassen en nog niet eerder gedekte wijfjes van vergelijkbare leeftijd en grootte gedurende ten minste vijf dagen aan de laboratoriumomstandigheden gewend, waarna men ze laat paren met mannetjes waarvan vaststaat dat zij vruchtbaar zijn. Na inseminatie worden de dieren op willekeurige wijze in de te behandelen groepen ingedeeld. De bevruchting kan geschieden via paring of kunstmatige inseminatie. Kort na de implantatie en gedurende de hele periode van organogenese wordt de teststof dagelijks aan de vrouwtjes toegediend. Daags voor de worp worden de foetussen door middel van hysterectomie verlost en onderzocht op viscerale en skeletafwijkingen, met inbegrip van groeivertraging, vertraagde beenvorming en intestinale bloedingen.

Proefomstandigheden

Proefdieren

De gewoonlijk gebruikte diersoorten zijn de rat, de muis, de hamster en het konijn. Rat en konijn verdienen de voorkeur. Er dient gebruik te worden gemaakt van gewoonlijk in laboratoria gebruikte stammen. De vruchtbaarheid van de stam mag niet te laag zijn en de stam moet voor wat betreft de reactie op teratogenen gekarakteriseerd zijn. De dieren moeten apart in kooien worden ondergebracht.

Aantal en geslacht

Voor ieder dosisniveau zijn ten minste twintig drachtige ratten, muizen of hamsters, dan wel twaalf drachtige konijnen vereist. Dit om ervoor te zorgen dat er voldoende worpen en jongen zijn om de teratogene eigenschappen van de stof te kunnen beoordelen.

Dosisniveaus

Er dienen ten minste drie dosisgroepen en een controlegroep te worden gebruikt. Wanneer de teststof in een medium wordt toegediend, is ook een mediumcontrolegroep vereist. Wordt van een medium gebruik gemaakt, dan moeten de toxicologische eigenschappen ervan bekend zijn; het mag niet teratogeen zijn en ook geen effecten op de reproduktie hebben. Afgezien van de toediening van de teststof moeten de dieren in de controlegroep(en) op

dezelfde wijze worden behandeld als de dieren in de proefgroep. Tenzij de fysisch/chemische of biologische eigenschappen van de stof dat niet toelaten, moet het hoogste dosisniveau in het ideale geval leiden tot enige duidelijk zichtbare tekenen van toxiciteit bij het moederdier, zoals een gering gewichtsverlies, maar het aantal sterfgevallen onder de moederdieren mag niet meer dan 10 % bedragen. Bij het laagste dosisniveau mogen geen waarneembare, aan de teststof toe te schrijven effecten optreden. De tussenliggende doses moeten geometrisch tussen het hoge en lage dosisniveau worden verdeeld.

Hoogste te testen dosis

Als er in het geval van stoffen met een lage toxiciteit bij een dosisniveau van ten minste 1 000 mg/kg geen tekenen van embryotoxiciteit of teratogeniteit optreden, zijn proeven met andere dosisniveaus wellicht niet noodzakelijk. Als er bij een dosis van minder dan 1 000 mg/kg duidelijke tekenen van toxiciteit bij het moederdier (zoals hierboven omschreven) optreden, maar geen nadelige effecten op het embryo, zijn proeven met andere dosisniveaus wellicht niet noodzakelijk.

Blootstellingsduur

Dag 0 bij de proef is de dag waarop een vaginale plug en/of sperma wordt waargenomen (waar mogelijk). De doseringsperiode moet samenvallen met de periode van organogenese. Voor de rat en de muis is dat de zesde tot en met de vijftiende dag, voor de hamster de zesde tot en met de veertiende en voor het konijn de zesde tot en met de achttiende. Indien als dag 0 de dag van paring of kunstmatige inseminatie wordt aangehouden, moet bij de vermelde tijden een dag worden opgeteld. Een andere methode is, de dosering tot ongeveer één dag voor de vermoedelijke werpdatum voort te zetten.

Observatieperiode

Ten minste eenmaal per dag dient een zorgvuldig klinisch onderzoek te worden verricht. Daarnaast dienen dagelijks waarnemingen te worden verricht en de nodige maatregelen te worden genomen om ervoor te zorgen dat zo min mogelijk dieren voor de studie verloren gaan.

Uitvoering

De teststof wordt oraal via een maagsonde toegediend. De teststof moet elke dag op ongeveer hetzelfde tijdstip worden toegediend.

De vrouwelijke proefdieren worden gedurende de toepasselijke behandelingsperiode dagelijks met de teststof behandeld. Voor de bepaling van de dosis kan worden uitgegaan van het gewicht van de wijfjes bij het begin van de toediening van de stof; ook kunnen de dieren, gezien de snelle gewichtstoename tijdens de dracht, op gezette tijden worden gewogen en kan de dosering worden gebaseerd op het laatst vastgestelde gewicht. Tekenen van toxiciteit moeten, zodra zij worden waargenomen, samen met het tijdstip waarop deze voor het eerst zijn opgetreden, de mate en de duur van de toxiciteit worden vastgelegd. Wijfjes die tekenen van abortus of partus praematurus vertonen, moeten worden gedood en aan een grondig macroscopisch onderzoek worden onderworpen. De dieren moeten na de behandeling worden geobserveerd tot ongeveer een dag voor de worp; zo wordt het grootste deel van de drachttijd bestreken, maar worden complicaties bij de interpretatie van de resultaten, die zich als gevolg van een natuurlijke geboorte zouden kunnen voordoen, vermeden. Bij het observeren van de dieren in de kooien moet onder meer aandacht worden besteed aan veranderingen in huid en vacht, ogen en slijmvliezen, ademhaling, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag. Het verbruik van voer moet wekelijks worden gemeten; de dieren moeten wekelijks worden gewogen.

Necropsie

Als het moederdier tijdens of aan het einde van het onderzoek sterft, moet het macroscopisch worden onderzocht op eventuele structurele afwijkingen of pathologische veranderingen die van invloed kunnen zijn geweest op de dracht. Onmiddellijk na de dood dient de uterus te worden verwijderd en de inhoud ervan te worden onderzocht op dode embryo's of foetussen en het aantal levende foetussen. Doorgaans is het mogelijk de tijd waarop de dood in utero is ingetreden, te schatten. Bij ratten en konijnen kan het aantal corpora lutea worden bepaald. Het geslacht van de foetussen moet worden bepaald en zij moeten afzonderlijk worden gewogen, waarna de gewichten worden opgetekend zodat daaruit het gemiddelde foetale gewicht kan worden afgeleid. Na verwijdering dient elke foetus uitwendig te worden onderzocht. Bij ratten, muizen en hamsters moet een derde tot de helft van elke worp worden geprepareerd en onderzocht op skeletafwijkingen, terwijl het resterende gedeelte van elke worp moet worden geprepareerd en onderzocht op afwijkingen aan de zachte weefsels, een en ander met gebruikmaking van de voor dat doel geschikte methoden. Bij konijnen moet elke foetus door middel van zorgvuldige sectie worden onderzocht op viscerale afwijkingen en vervolgens op skeletafwijkingen.

2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het aantal dat drachtig werd, het aantal en de percentages levende foetussen en foetussen met afwijkingen aan de zachte weefsels of het skelet, en de relatie daarvan tot het nest waaruit zij komen. De resultaten moeten met behulp van een voor dit doel geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere algemeen erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

3. VERSLAGGEVING

3.1. **Verslag van de proefnemingen**

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

— diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voer, enzovoort;

— proefomstandigheden;

— dosisniveaus (met het eventuele medium) en concentraties;

— gegevens over de toxische reactie naar dosis;

— waar mogelijk, het dosisniveau waarop geen effect is waargenomen;

— tijdstip gedurende de studie waarop de dood intreedt of aangeven of dieren tot het einde van de proef in leven bleven;

— beschrijving van toxische of andere effecten;

— tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en verloop hiervan;

— gegevens over voer en lichaamsgewicht;

— duur van de dracht en gegevens over de worp (gegevens uit het verleden inbegrepen);

— gegevens over de foetussen (levend/dood, geslacht, afwijkingen aan de zachte weefsels en het skelet);

— gegevens over de worp (levend/dood, geslacht, voor elke worp afwijkingen aan de zachte weefsels en het skelet);

— statistische verwerking van de resultaten;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. LITERATUUR

Zie Algemene inleiding — Deel B.

CHRONISCHE TOXICITEITSTEST

1. METHODE

1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. Definities

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. Referentiestoffen

Geen.

1.4. Principe van de onderzoekmethode

De teststof wordt normaal gesproken zeven dagen per week langs een geschikte weg aan verscheidene groepen proefdieren gedurende een groot deel van hun levensduur toegediend. Er wordt een dosis per groep gebruikt. Tijdens en na de blootstelling aan de teststof worden de proefdieren dagelijks op tekenen van toxiciteit onderzocht.

1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

Voorbereidingen

Voor het onderzoek worden de dieren ten minste vijf dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Voor het onderzoek worden gezonde, jonge dieren op willekeurige wijze in de te behandelen en controlegroepen ingedeeld.

Proefomstandigheden

Proefdieren

Er wordt de voorkeur gegeven aan ratten. Op grond van de resultaten van eerder uitgevoerd onderzoek mogen ook andere diersoorten (knaagdieren of niet-knaagdieren) worden gebruikt. Er dient gebruik te worden gemaakt van stammen van jonge, gezonde dieren die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt. Met de dosering dient zo spoedig mogelijk na het verspenen te worden begonnen.

Bij het begin van het onderzoek mag het gewicht van de dieren niet meer dan ± 20 % van het gemiddelde gewicht afwijken. Indien een studie naar de subchronische orale toxiciteit is uitgevoerd ter voorbereiding op een chronisch toxiciteitsonderzoek, dienen in beide studies dezelfde soort en stam te worden gebruikt.

Aantal en geslacht

Bij knaagdieren moeten voor ieder dosisniveau en de parallelle controlegroep ten minste 40 dieren (20 wijfjes en 20 mannetjes) worden gebruikt. De wijfjes moeten nulliparae zijn en mogen niet drachtig zijn. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal worden verhoogd met het aantal dieren dat volgens plan voor de voltooiing van de studie zal worden gedood.

In het geval van niet-knaagdieren kan worden volstaan met een kleiner aantal dieren, doch ten minste vier per geslacht per groep.

Dosisniveaus en frequentie van de blootstelling

Naast de parallelle controlegroep dienen ten minste drie dosisniveaus te worden gebruikt. Het hoogste dosisniveau moet leiden tot duidelijke tekenen van toxiciteit, zonder dat het evenwel leidt tot overmatige sterfte onder de dieren. Bij het laagste dosisniveau mogen geen tekenen van toxiciteit optreden.

De tussenliggende doses moeten worden gekozen in een gebied halverwege tussen de hoge en de lage dosis.

Bij de keuze van de dosisniveaus dient rekening te worden gehouden met de gegevens uit eerder uitgevoerd toxiciteitsonderzoek.

De frequentie van de blootstelling is normaliter dagelijks. Indien de teststof in het drinkwater wordt toegediend of met het voer wordt gemengd, dient dit steeds beschikbaar te zijn.

Controlegroepen

Er dient gebruik te worden gemaakt van een parallelle controlegroep die, afgezien van de blootstelling aan de teststof, in elk opzicht identiek is aan de behandelde groepen.

In speciale omstandigheden, zoals bij inhalatiestudies met aërosolen of bij het gebruik van een emulgator van niet-gekarakteriseerde biologische activiteit in orale studies, dient ook een negatieve controlegroep te worden gebruikt. De negatieve controlegroep wordt op dezelfde wijze behandeld als alle andere proefdieren, met dien verstande dat deze controlegroep niet aan de teststof of een medium moet worden blootgesteld.

Toedieningsweg

Toediening geschiedt voornamelijk oraal of via inhalatie. De keuze van de toedieningsweg hangt af van de fysische en chemische eigenschappen van de teststof en de meest waarschijnlijke blootstellingsweg bij de mens.

Toediening via de huid levert aanzienlijke praktische problemen op. Chronische systemische toxiciteit die het resultaat is van opname via de huid, kan normaal gesproken worden afgeleid uit de resultaten van de orale test en de mate van absorptie via de huid, die kan worden afgeleid uit eerder uitgevoerd onderzoek naar de percutane toxiciteit.

Orale studies

Indien de teststof in het maag-darmkanaal wordt geresorbeerd, en de blootstelling van de mens onder meer langs orale weg plaatsvindt, verdient orale toediening de voorkeur, tenzij er contra-indicaties zijn.

De dieren moeten de teststof toegediend krijgen in hun voer, opgelost in het drinkwater of in capsules. In het ideale geval dient de dosis zeven dagen per week dagelijks te worden toegediend, omdat bij dosering gedurende vijf dagen per week het dier zich in de tijd dat geen dosis wordt toegediend, eventueel herstelt of de toxiciteitsverschijnselen verdwijnen, waardoor de resultaten en de evaluatie daarvan kunnen worden beïnvloed. Voornamelijk uit praktische overwegingen echter wordt dosering gedurende vijf dagen per week aanvaardbaar geacht.

Inhalatiestudies

Aangezien bij inhalatiestudies de technische problemen ingewikkelder zijn dan bij andere toedieningswegen het geval is, volgen hieronder meer gedetailleerde aanwijzingen met betrekking tot deze wijze van toediening. In specifieke situaties vormt intratracheale instillatie wellicht een deugdelijk alternatief.

Bij chronische blootstellingen baseert men zich gewoonlijk op de verwachte praktijksituatie in de industrie, in welk geval de dieren vijf dagen per week gedurende zes uur na het bereiken van de juiste concentratie in de blootstellingskamer worden blootgesteld (onderbroken blootstelling), of op een mogelijke blootstelling in het milieu, in welk geval de dieren zeven dagen per week gedurende 22 tot 24 uur per dag worden blootgesteld (continue expositie), met ongeveer een uur voor het voederen van de dieren (iedere dag op dezelfde tijd) en het schoonmaken van de kamer. In beide gevallen worden de dieren gewoonlijk blootgesteld aan een vaste concentratie van teststoffen. Een belangrijk verschil tussen onderbroken en continue expositie is dat er bij de eerste een periode van zeventien tot achttien uur is, waarin de dieren zich van de effecten van elke dagelijkse expositie kunnen herstellen; gedurende de weekeinden is deze herstelperiode nog langer.

De keuze tussen onderbroken of continue blootstelling hangt af van de doeleinden van het onderzoek en van de na te bootsen situatie bij de mens. Bepaalde technische moeilijkheden verdienen echter de aandacht. Zo kunnen bijvoorbeeld de voordelen van continue expositie voor het simuleren van de milieucondities wegvallen in verband met de noodzaak de dieren tijdens de blootstelling te eten en te drinken te geven, en de behoefte aan meer gecompliceerde (en betrouwbaardere) aërosol- en gasgeneratietechnieken en meettechnieken.

Blootstellingskamers

De dieren worden aan de teststoffen blootgesteld in inhalatiekamers die zodanig gebouwd moeten zijn dat kan worden gezorgd voor een dynamische luchtdoorstroming van ten minste twaalf luchtverversingen per uur, een toereikend zuurstofgehalte en een gelijkmatige verdeling van de teststof in de atmosfeer. De controle- en blootstellingskamers dienen qua structuur identiek te zijn, zodat, behalve waar het de blootstelling aan de teststoffen aangaat, in alle opzichten vergelijkbare blootstellingsomstandigheden gewaarborgd zijn. Binnen de kamer wordt over het algemeen een geringe onderdruk gehandhaafd om te voorkomen dat de teststof naar buiten lekt. De kamers dienen zodanig te zijn ontworpen dat de dieren elkaar zo min mogelijk verdringen. Als algemene regel voor het verzekeren van een stabiele atmosfeer in de blootstellingskamer geldt dat het totale volume van de proefdieren niet meer mag bedragen dan 5 % van het volume van de kamer.

De volgende parameters moeten worden gemeten of gecontroleerd:

i) Luchtdoorstroming: het aantal verversingen per uur in de kamer dient bij voorkeur continu te worden gemeten.

ii) Tijdens de dagelijkse blootstelling mag de concentratie met niet meer dan ± 15 % van het gemiddelde afwijken. Tijdens de gehele duur van de studie moeten de dagelijkse concentraties zo constant mogelijk worden gehouden.

iii) Temperatuur en vochtigheid: voor knaagdieren moet de temperatuur op 22 °C (± 2 °C) en de vochtigheid in de kamer op 30 tot 70 % worden gehouden, behalve wanneer water wordt gebruikt om de teststof in de atmosfeer van de expositiekamer te verstuiven. Beide waarden dienen bij voorkeur continu te worden gemeten.

iv) Metingen van de deeltjesgrootte: wanneer de atmosfeer vloeibare of vaste aërosolen bevat, moet de verdeling van de deeltjesgrootte worden bepaald. De aërosoldeeltjes dienen een zodanige afmeting te hebben dat zij voor de gebruikte proefdieren in te ademen zijn. Monsters van de atmosfeer in de kamer dienen te worden genomen op ademhalingshoogte van de dieren. Het luchtmonster dient representatief te zijn voor de verdeling van de deeltjes waaraan de dieren zijn blootgesteld en dient, op gravimetrische basis, alle aërosoldeeltjes te bevatten, zelfs wanneer een groot gedeelte daarvan niet in te ademen is. Gedurende de werking van de apparatuur voor de verstuiving van de aërosoldeeltjes moeten regelmatig analyses worden uitgevoerd van de deeltjesgrootte, ten einde de stabiliteit van het aërosol na te gaan, en daarna tijdens de blootstelling zo vaak als nodig is om de stabiliteit van de verdeling van de deeltjesgrootte waaraan de dieren zijn blootgesteld, te bepalen.

Duur van het onderzoek

De toedieningsperiode dient ten minste twaalf maanden te bedragen.

Uitvoering

Waarnemingen

Ten minste éénmaal per dag dient een zorgvuldig klinisch onderzoek te worden verricht. Iedere dag moeten aanvullende waarnemingen worden gedaan, waarbij ervoor moet worden gezorgd dat er zo weinig mogelijk dieren voor het onderzoek verloren gaan, bijvoorbeeld door necropsie te verrichten op dood aangetroffen dieren of deze gekoeld te bewaren en afzondering of opoffering van zwakke of stervende dieren. Er moeten zorgvuldige waarnemingen worden gedaan, ten einde het optreden en ontwikkelen van alle toxische effecten te ontdekken en ervoor te zorgen dat er zo min mogelijk dieren verloren gaan als gevolg van ziekte, autolyse of kannibalisme.

Klinische tekenen, waaronder ook neurologische en oculaire veranderingen en sterfte, moeten voor alle dieren worden vastgesteld. Het tijdstip waarop de toxische verschijnselen, met inbegrip van verdachte tumoren, voor het eerst optreden, en de ontwikkeling ervan, dienen te worden vastgelegd.

Gedurende de eerste dertien weken van het onderzoek dient het lichaamsgewicht van elk dier afzonderlijk eenmaal per week te worden vastgelegd; daarna ten minste om de vier weken. Gedurende de eerste dertien weken van het onderzoek dient het verbruik van voer wekelijks te worden bepaald; daarna om de drie maanden, tenzij wijzigingen in de gezondheidstoestand of het lichaamsgewicht van het dier anders voorschrijven.

Hematologisch onderzoek

Een hematologisch onderzoek (bij voorbeeld hemoglobinegehalte, hematocriet, totaal aantal rode bloedlichaampjes, totaal aantal witte bloedlichaampjes, bloedplaatjes of andere metingen van de stollingseigenschappen) dient te worden verricht na drie maanden, zes maanden en vervolgens om de zes maanden en aan het einde van het onderzoek op bloedmonsters van alle niet-knaagdieren en van tien ratten per geslacht uit alle groepen. Indien mogelijk dienen deze monsters telkens afkomstig te zijn van dezelfde ratten. Bij niet-knaagdieren dient bovendien vóór de test een monster te worden genomen.

Indien op grond van klinische waarnemingen wordt vermoed dat de gezondheidstoestand van de dieren tijdens het onderzoek achteruitgaat, dient bij de betrokken dieren een differentiële telling van bloedcellen te worden uitgevoerd.

Een differentiële telling van bloedcellen wordt uitgevoerd op monsters afkomstig van de dieren in de hoogste dosisgroep en de controlegroep. Bij de daaropvolgende lagere groep(en) worden alleen differentiële tellingen van bloedcellen verricht als er tussen de hoogste groep en de controlegroepen een groot verschil bestaat of als daartoe op grond van het pathologisch onderzoek een indicatie wordt gegeven.

Urineonderzoek

Van alle niet-knaagdieren en van tien ratten per geslacht uit alle groepen, indien mogelijk van dezelfde ratten en met dezelfde tussenpozen als bij het bloedonderzoek, moeten met het oog op een analyse urinemonsters worden genomen. In het geval van knaagdieren dienen bij de afzonderlijke dieren of op een samengevoegd monster per geslacht per groep de volgende bepalingen te worden verricht:

— uiterlijk: volume en dichtheid voor de afzonderlijke dieren;

— eiwit, glucose, ketonen, occult bloed (semi-kwantitatief);

en

— microscopie van sediment (semi-kwantitatief).

Klinische biochemie

Ongeveer om de zes maanden en aan het einde van het onderzoek worden bloedmonsters voor klinisch-biochemische metingen genomen bij alle niet-knaagdieren en bij tien ratten per geslacht uit alle groepen, indien mogelijk steeds bij dezelfde ratten. Bij niet-knaagdieren dient bovendien voor het onderzoek een monster te worden genomen. Uit deze monsters wordt het plasma bereid, waarop de volgende bepalingen worden verricht:

— totaal eiwitgehalte;

— albuminegehalte;

— leverfunctietesten (zoals alkalische fosfataseactiviteit, glutamaatpyruvaattransaminase(1)activiteit en glutamaatoxaalacetaattransaminase(2)activiteit), gammaglutamyltranspeptidase, ornithinedecarboxylase;

— koolhydraatstofwisseling, zoals nuchter glucosegehalte van het bloed;

— nierfunctietesten zoals ureumstikstof in het bloed.

Macroscopische necropsie

Op alle dieren, ook die welke tijdens het experiment stierven of gedood werden toen zij stervende waren, moet een volledig macroscopisch onderzoek worden verricht. Van alle dieren moeten, voordat zij gedood worden, bloedmonsters worden genomen voor differentiële tellingen van bloedcellen. Alle met het blote oog zichtbare letsels, tumoren of letsels waarvan wordt aangenomen dat het tumoren zijn, dienen te worden bewaard. Getracht moet worden om de macroscopische waarnemingen te correleren aan de microscopische bevindingen.

Alle organen en weefsels dienen voor microscopisch onderzoek te worden bewaard. Gewoonlijk zijn dat de volgende organen en weefsels: hersenen (3) (medulla/pons, cortex cerebelli, cortex cerebri), hypofyse, schildklier (met bijschildklieren), thymus, longen (met luchtpijp), hart, aorta, speekselklieren, lever (3), milt, nieren, bijnieren, slokdarm, maag, duodenum, jejunum, ileum, blinde darm, colon, rectum, uterus, urineblaas, lymfklieren, alvleesklier, geslachtsklieren (3), secundaire geslachtsorganen, vrouwelijke borstklier, huid, spieren, perifere zenuwen, ruggemerg (cervicaal, thoracaal, lumbaal), borstbeen met beenmerg, dijbeen (met gewricht) en ogen. Vullen van de longen en urineblaas met een fixatief is de beste manier om deze weefsels te bewaren. Bij inhalatiestudies is het vullen van de longen van wezenlijk belang voor een goed histopathologisch onderzoek. Bij speciale studies zoals inhalatiestudies dient de gehele tractus respiratorius te worden onderzocht, inclusief neus, pharynx en larynx.

Indien nog ander klinisch onderzoek wordt verricht, dient de daaruit verkregen informatie vóór het microscopisch onderzoek beschikbaar te zijn, omdat dit voor de patholoog belangrijke aanwijzingen kan bevatten.

Histopathologie

Alle zichtbare veranderingen, in het bijzonder tumoren en andere letsels in enig orgaan, dienen microscopisch te worden onderzocht. Daarnaast verdient het aanbeveling nog de volgende onderzoekingen te verrichten:

a) Microscopisch onderzoek van alle bewaarde organen en weefsels met een volledige beschrijving van alle geconstateerde letsels bij:
   1. alle dieren die tijdens het onderzoek stierven of werden gedood;
   2. alle dieren uit de groep met de hoogste dosis en de controlegroepen.

b) Organen en weefsels die afwijkingen vertonen die veroorzaakt (kunnen) zijn door de teststof, worden ook bij de lagere dosisgroepen onderzocht.

c) Mocht uit het experiment blijken dat de normale levensduur van de dieren aanzienlijk wordt verkort of dat er effecten geïnduceerd worden die een toxische reactie zouden kunnen beïnvloeden, dan moet de eerstvolgende lagere dosisgroep worden onderzocht zoals hierboven beschreven.

d) Voor een juiste beoordeling van de betekenis van de bij de blootgestelde dieren waargenomen veranderingen is bekendheid met het voorkomen van letsels die bij de gebruikte dierstam gewoonlijk voorkomen (onder dezelfde laboratoriumomstandigheden, dat wil zeggen controlegegevens uit het verleden) onontbeerlijk.

(1) Thans bekend als serumalanineaminotransferase.
(2) Thans bekend als serumspartaataminotransferase.
(3) Deze organen, afkomstig van tien dieren per geslacht per groep voor knaagdieren en van alle niet-knaagdieren, alsmede de schildklier (met bijschildklieren) voor alle niet-knaagdieren, dienen te worden gewogen.

2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het aantal dieren dat letsels vertoont, en het percentage dieren waarbij ieder type letsel voorkomt. De resultaten moeten met behulp van een voor dit doel geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

3. VERSLAGGEVING

3.1. **Verslag van de proefnemingen**

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

— diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voer, enzovoort;

— proefomstandigheden:

Beschrijving van de blootstellingsapparatuur:

Met inbegrip van ontwerp, type, afmetingen, luchtbron, systeem voor het bereiden van stof- en vloeistof-aërosolen, methode voor het conditioneren van de lucht, behandeling van de afgewerkte lucht en wijze waarop de dieren tijdens de proeven in een blootstellingskamer zijn ondergebracht als deze wordt gebruikt. Er moet een beschrijving worden gegeven van de apparatuur voor het meten van de temperatuur, de vochtigheid en, in voorkomend geval, de stabiliteit van de concentratie en de deeltjesgrootte van de aërosolen.

Gegevens betreffende de blootstelling:

Deze moeten in tabelvorm worden gerangschikt en voorzien worden van gemiddelde waarden en een maat voor de variabiliteit (bij voorbeeld standaarddeviatie). Ze dienen te omvatten:

a) het aantal luchtverversingen per uur in de inhalatieapparatuur;
b) temperatuur en vochtigheid van de lucht;
c) nominale concentraties (de totale hoeveelheid teststof die de inhalatieapparatuur wordt binnengeleid, gedeeld door het luchtvolume);
d) aard van het eventuele medium;
e) feitelijke concentraties van de teststof in het ademhalingsgebied van de dieren;
f) mediaan van de deeltjesgrootte (in voorkomend geval).

— dosisniveaus (met het eventuele medium) en concentraties;

— gegevens over de toxische reactie naar geslacht en dosis;

— dosis- of concentratieniveau waarop geen effect is waargenomen;

— tijdstip gedurende het onderzoek waarop de dood intreedt of aangeven of dieren tot het einde van de proef in leven bleven;

— beschrijving van toxische of andere effecten;

— tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en verloop hiervan;

— gegevens over voer en lichaamsgewicht;

— oftalmologische bevindingen;

— uitgevoerd hematologisch onderzoek en alle resultaten;

— uitgevoerd klinisch-biochemisch onderzoek en alle resultaten (met inbegrip van resultaten van het urineonderzoek);

— bevindingen van de necropsie;

— gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;

— statistische verwerking van de resultaten, waar dat mogelijk is;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. LITERATUUR

Zie Algemene inleiding — Deel B.

CARCINOGENITEITSONDERZOEK

1. METHODE

1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. Definities

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. Referentiestoffen

Geen.

1.4. Principe van de onderzoekmethode

De teststof wordt normaal gesproken zeven dagen per week langs een geschikte weg aan verscheidene groepen proefdieren gedurende een groot deel van hun levensduur toegediend. Er wordt een dosis per groep gebruikt. Tijdens en na de blootstelling aan de teststof worden de proefdieren dagelijks op tekenen van toxiciteit onderzocht, met name op zich ontwikkelende tumoren.

1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

Voor het onderzoek worden de dieren ten minste vijf dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Voor het onderzoek worden gezonde, jonge dieren op willekeurige wijze in de te behandelen en controlegroepen ingedeeld.

Proefdieren

Er wordt de voorkeur gegeven aan ratten. Op grond van de resultaten van eerder uitgevoerd onderzoek mogen ook andere diersoorten (knaagdieren of niet-knaagdieren) worden gebruikt. Er dient gebruik te worden gemaakt van stammen van jonge, gezonde dieren die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt en met de dosering dient zo spoedig mogelijk na het spenen te worden begonnen.

Bij het begin van het onderzoek mag het gewicht van de dieren niet meer dan ± 20 % van het gemiddelde gewicht afwijken. Indien een studie naar de subchronische orale toxiciteit is uitgevoerd ter voorbereiding op een chronisch toxiciteitsonderzoek, dienen in beide studies dezelfde soort en stam te worden gebruikt.

Aantal en geslacht

Voor ieder dosisniveau en de parallelle controlegroep moeten ten minste 100 dieren (50 wijfjes en 50 mannetjes) worden gebruikt. De wijfjes moeten nulliparae zijn en mogen niet drachtig zijn. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal worden verhoogd met het aantal dieren dat volgens plan voor de voltooiing van de studie zal worden gedood.

Dosisniveaus en frequentie van blootstelling

Naast de parallelle controlegroep dienen ten minste drie dosisniveaus te worden gebruikt. Het hoogste dosisniveau moet leiden tot tekenen van minimale toxiciteit, zoals een lichte achteruitgang van de gewichtstoename (minder dan 10 %), zonder dat daardoor de normale levensduur als gevolg van andere effecten dan tumoren aanzienlijk wordt verkort.

Bij de laagste dosis mogen de normale groei, ontwikkeling en levensduur van het dier niet worden verstoord en mogen geen tekenen van toxiciteit optreden. In het algemeen dient deze dosis niet lager te zijn dan 10 % van de hoogste dosis.

De tussenliggende doses moeten worden gekozen in een gebied halverwege tussen de hoge en de lage dosis.

Bij de keuze van de dosisniveaus dient rekening te worden gehouden met de gegevens uit eerder uitgevoerd toxiciteitsonderzoek.

De frequentie van de blootstelling is normaliter dagelijks. Indien de teststof in het drinkwater wordt toegediend of met het voer wordt gemengd, dient dit steeds beschikbaar te zijn.

Controlegroepen

Er dient gebruik te worden gemaakt van een parallelle controlegroep die, afgezien van de blootstelling aan de teststof, in elk opzicht identiek is aan de behandelde groepen.

In speciale omstandigheden, zoals bij inhalatiestudies met aërosolen of bij gebruik van een emulgator met onbekende biologische activiteit via de orale weg, dient ook van een extra controlegroep gebruik te worden gemaakt, waarbij het medium wordt weggelaten.

Toedieningsweg

De drie belangrijkste toedieningswegen zijn de orale, de dermale en de inhalatieweg. De keuze van de toedieningsweg hangt af van de fysische en chemische eigenschappen van de teststof en de meest waarschijnlijke blootstellingsroute bij de mens.

Orale studies

Indien de teststof in het maag-darmkanaal wordt geresorbeerd en de blootstelling van de mens onder meer langs de orale weg geschiedt, verdient orale toediening de voorkeur, tenzij er contra-indicaties zijn. De dieren moeten de teststof toegediend krijgen in hun voedsel, opgelost in het drinkwater of in capsules.

In het ideale geval dient de dosis zeven dagen per week dagelijks te worden toegediend, omdat bij dosering gedurende vijf dagen per week het dier zich in de tijd dat geen dosis wordt toegediend eventueel herstelt of de toxiciteitsverschijnselen verdwijnen, waardoor de resultaten en de evaluatie daarvan kunnen worden beïnvloed. Voornamelijk uit praktische overwegingen echter wordt dosering gedurende vijf dagen per week aanvaardbaar geacht.

Dermale studies

Dermale blootstelling door het aanbrengen van de teststof op de huid kan worden gekozen om een belangrijke blootstellingsweg bij de mens te simuleren en als model voor de inductie van huidletsels.

Inhalatiestudies

Aangezien bij inhalatiestudies de technische problemen ingewikkelder zijn dan bij andere toedieningswegen het geval is, volgen hieronder meer gedetailleerde aanwijzingen met betrekking op deze wijze van toediening. In specifieke omstandigheden is intratracheale instillatie wellicht een deugdelijk alternatief.

Bij chronische blootstellingen baseert men zich gewoonlijk op de verwachte praktijksituatie in de industrie, in welk geval de dieren vijf dagen per week gedurende zes uur na het bereiken van de juiste concentratie in de blootstellingskamer worden blootgesteld (onderbroken blootstelling), of op een mogelijke blootstelling in het milieu, in welk geval de dieren zeven dagen per week gedurende 22 tot 24 uur per dag worden blootgesteld (continue blootstelling), met ongeveer een uur voor het voederen van de dieren (iedere dag op dezelfde tijd) en het schoonmaken van de kamer. In beide gevallen worden de dieren doorgaans blootgesteld aan een vaste concentratie van teststoffen. Een belangrijk verschil tussen onderbroken en continue blootstelling is dat er bij de eerste een periode van zeventien tot achttien uur is waarin de dieren zich van de effecten van elke dagelijkse blootstelling kunnen herstellen; gedurende de weekeinden is deze herstelperiode nog langer.

De keuze tussen onderbroken of continue blootstelling hangt af van de doeleinden van het onderzoek en van de na te bootsen omstandigheden bij de mens. Bepaalde technische moeilijkheden verdienen echter de aandacht. Zo kunnen bij voorbeeld de voordelen van continue blootstelling voor het nabootsen van de milieucondities wegvallen in verband met de noodzaak de dieren tijdens de blootstelling te eten en te drinken te geven, en de behoefte aan meer gecompliceerde en betrouwbare aërosol- en gasgeneratietechnieken en meettechnieken.

Blootstellingskamers

De dieren worden aan de teststoffen blootgesteld in inhalatiekamers die zodanig gebouwd moeten zijn dat kan worden gezorgd voor een dynamische luchtdoorstroming van ten minste twaalf luchtverversingen per uur, een toereikend zuurstofgehalte en een gelijkmatige verdeling van de teststof in de atmosfeer. De controle- en blootstellingskamers moeten qua structuur identiek zijn, zodat, behalve waar het de blootstelling aan de teststoffen betreft, in alle opzichten vergelijkbare blootstellingsomstandigheden gewaarborgd zijn. Binnen de kamer wordt

over het algemeen een geringe onderdruk gehandhaafd om te voorkomen dat de teststof naar buiten lekt. De blootstellingskamers moeten zodanig zijn ontworpen dat de dieren elkaar zo min mogelijk verdringen. Als algemene regel voor het verzekeren van een stabiele atmosfeer in de blootstellingskamer geldt dat het totale volume van de proefdieren niet meer mag bedragen dan 5 % van het volume van de kamer.

De volgende parameters moeten worden gemeten of gecontroleerd:

i) Luchtdoorstroming: het aantal luchtverversingen per uur in de kamer dient bij voorkeur continu te worden gemeten.

ii) Tijdens de dagelijkse blootstelling mag de concentratie met niet meer dan ± 15 % van het gemiddelde afwijken. Tijdens de gehele duur van de studie moeten de dagelijkse concentraties zo constant mogelijk worden gehouden.

iii) Temperatuur en vochtigheid: voor knaagdieren dient de temperatuur op 22 °C (± 2 °C) en de vochtigheid in de kamer op 30 tot 70 % te worden gehouden, behalve wanneer water wordt gebruikt om de teststof in de atmosfeer van de blootstellingskamer te verstuiven. Beide waarden dienen bij voorkeur continu te worden gemeten.

iv) Metingen van de deeltjesgrootte: wanneer de atmosfeer vloeibare of vaste aërosolen bevat, dient de verdeling van de deeltjesgrootte te worden bepaald. De aërosoldeeltjes dienen een zodanige afmeting te hebben dat zij voor de gebruikte proefdieren in te ademen zijn. Monsters van de atmosfeer in de kamer dienen te worden genomen op ademhalingshoogte van de dieren. Het luchtmonster dient representatief te zijn voor de verdeling van de deeltjes waaraan de dieren zijn blootgesteld en dient, op gravimetrische basis, alle aërosoldeeltjes te bevatten, zelfs wanneer een groot gedeelte daarvan niet in te ademen is. Gedurende de werking van de apparatuur voor het verstuiven van deeltjes moeten regelmatig analyses worden uitgevoerd van de deeltjesgrootte, ten einde de stabiliteit van de aërosol na te gaan, en daarna tijdens de blootstelling zo vaak als nodig is om de stabiliteit van de verdeling van de deeltjesgrootte waaraan de dieren zijn blootgesteld te bepalen.

Duur van het onderzoek

Een carcinogeniteitstest beslaat het grootste deel van de normale levensduur van de proefdieren. Bij muizen en hamsters dient het onderzoek na achttien maanden te worden beëindigd, bij ratten na 24 maanden; voor bepaalde dierstammen met een langere levensduur en/of een laag percentage spontane tumoren dient de studie te worden beëindigd na 24 maanden bij muizen en hamsters en na 30 maanden bij ratten. Een dergelijk uitgebreid onderzoek kan echter worden beëindigd wanneer het aantal overlevende dieren in de groep met de laagste dosis of in de controlegroep 25 % bedraagt. Indien blijkt dat de geslachten duidelijk verschillend reageren, dienen de geslachten afzonderlijk te worden beschouwd. Als alleen dieren in de groep met de hoogste dosis vroegtijdig sterven en dit duidelijk aan toxiciteit te wijten is, betekent dit niet dat het onderzoek moet worden beëindigd, mits de toxische verschijnselen bij de andere groepen geen problemen veroorzaken. Wil een negatief testresultaat aanvaardbaar zijn, dan mag niet meer dan 10 % van een groep voor het experiment verloren gaan als gevolg van autolyse, kannibalisme of huisvestingsproblemen, en moet het percentage overlevende dieren in alle groepen na achttien maanden voor muizen en hamsters en na 24 maanden voor ratten ten minste 50 % bedragen.

Uitvoering

Waarnemingen

De dieren moeten dagelijks in de kooien worden geobserveerd. Daarbij moet aandacht worden besteed aan veranderingen in huid en vacht, ogen en slijmvliezen, alsmede ademhaling, bloedsomloop, het autonome en centrale zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag.

De dieren moeten regelmatig worden geobserveerd om te voorkomen dat zij voor de studie verloren gaan als gevolg van oorzaken als kannibalisme, autolyse van weefsels of het op verkeerde wijze in de kooien stoppen. Indien stervende dieren worden aangetroffen, moeten zij worden verwijderd; op hen wordt necropsie verricht.

Voor alle dieren dienen de klinische tekenen en sterfte te worden vastgelegd. Bijzondere aandacht moet worden besteed aan zich ontwikkelende tumoren; van elke met het blote oog zichtbare of voelbare tumor moeten het tijdstip waarop deze voor het eerst is opgetreden, de plaats, de afmetingen, het uiterlijk en het verloop worden opgetekend.

Gedurende de eerste dertien weken van het onderzoek dient het verbruik van voer (en water wanneer de teststof in het drinkwater wordt toegediend) wekelijks te worden gemeten; daarna ongeveer om de drie maanden, tenzij wijzigingen in de gezondheidstoestand of het lichaamsgewicht van het dier anders voorschrijven.

Gedurende de eerste dertien weken van het onderzoek dient het lichaamsgewicht voor elk dier afzonderlijk eens per week te worden vastgelegd; daarna ten minste om de vier weken.

Klinisch onderzoek

Hematologie

Als op grond van de observatie van de dieren in de kooien wordt vermoed dat de gezondheidstoestand van de dieren tijdens het onderzoek achteruit gaat, dient bij de betrokken dieren een differentiële telling van bloedcellen te worden uitgevoerd.

Na twaalf maanden, achttien maanden en voordat de dieren worden gedood, moet voor alle dieren een bloeduitstrijk worden gemaakt. Er wordt een differentiële telling van bloedcellen verricht op monsters afkomsting van de dieren in de groep met de hoogste dosis en de controlegroepen. Als het op grond van deze gegevens, met name die welke zijn verkregen vóór het doden van de dieren, of de gegevens van het pathologisch onderzoek nodig mocht blijken, moeten ook differentiële tellingen van bloedcellen worden verricht voor de eerstvolgende lagere dosisgroep(en).

Macroscopische necropsie

Op alle dieren, ook die welke tijdens het onderzoek stierven of werden gedood toen zij stervende waren, dient een volledige macroscopische necropsie te worden verricht. Alle met het blote oog zichtbare tumoren of letsels waarvan wordt aangenomen dat het tumoren zijn, dienen te worden bewaard.

De volgende organen en weefsels dienen in een geschikt medium voor eventueel later histopathologisch onderzoek te worden bewaard: alle met het blote oog zichtbare letsels, hersenen (met inbegrip van delen van medulla/pons, cortex cerebelli en cortex cerebri), hypofyse, schildklier/bijschildklieren, thymusweefsel, luchtpijp en longen, hart, aorta, speekselklieren, lever, milt, nieren, bijnieren, alvleesklier, geslachtsklieren, uterus, secundaire geslachtsorganen, huid, slokdarm, maag, duodenum, jejunum, ileum, blinde darm, colon, rectum, urineblaas, representatieve lymfklieren, vrouwelijke borstklier, dijbeenspieren, perifere zenuwen, borstbeen met beenmerg, dijbeen (met inbegrip van gewrichtsvlak), ruggemerg op drie plaatsen (cervicaal, mediothoracaal en lumbaal) en ogen.

Vullen van de longen en urineblaas met een fixatief is de beste manier om deze weefsels te bewaren. Bij inhalatiestudies is het vullen van de longen een eerste vereiste voor een goed histopathologisch onderzoek. Bij inhalatiestudies dient de gehele tractus respiratorius te worden bewaard, inclusief neusholte, pharynx en larynx.

Histopathologie

a) Er dient een volledig histopathologisch onderzoek te worden verricht op de organen en weefsels van alle dieren die sterven of tijdens het onderzoek worden gedood en alle dieren in de controlegroep en de groep met de hoge dosis.

b) Verder dienen alle met het blote oog zichtbare tumoren of letsels waarvan wordt vermoed dat het tumoren zijn, bij alle groepen histopathologisch te worden onderzocht.

c) Indien er een aanzienlijk verschil bestaat in de incidentie van neoplastische letsels tussen de groep met de hoogste dosis en de controlegroep, dient een histopathologisch onderzoek te worden uitgevoerd op het bewuste orgaan of weefsel bij de andere dosisgroepen.

d) Als het aantal overlevende dieren in de groep met de hoogste dosis aanmerkelijk kleiner is dan in de controlegroep, moet de eerstvolgende lagere dosisgroep volledig worden onderzocht.

e) Indien bij de hoogste dosisgroep blijkt dat er toxische of andere effecten geïnduceerd werden die van invloed zouden kunnen zijn op de neoplastische respons, dient de eerstvolgende lagere dosisgroep volledig te worden onderzocht.

2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het aantal dieren waarbij tijdens het onderzoek tumoren zijn ontdekt, het tijdstip waarop deze zijn ontdekt, en het aantal dieren dat, na te zijn gedood, tumoren blijkt te hebben. De resultaten moeten met behulp van een voor dit doel geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

3. VERSLAGGEVING

3.1. Verslag van de proefnemingen

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

— diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voer, enzovoort;

— proefomstandigheden:

Beschrijving van de blootstellingsapparatuur:

Met inbegrip van ontwerp, type, afmetingen, luchtbron, systeem voor het bereiden van stof- en vloeistof-aërosolen, methode voor het conditioneren van de lucht, behandeling van de afgewerkte lucht en wijze waarop de dieren tijdens de proeven in een blootstellingskamer zijn ondergebracht als deze wordt gebruikt. Er moet een beschrijving worden gegeven van de apparatuur voor het meten van de temperatuur, de vochtigheid en, in voorkomend geval, de stabiliteit van de concentratie en de deeltjesgrootte van de aërosolen.

Gegevens betreffende de blootstelling:

Deze moeten in tabelvorm worden gerangschikt en worden voorzien van gemiddelde waarden en een maat voor de variabiliteit (bij voorbeeld standaarddeviatie). Ze dienen te omvatten:

a) het aantal luchtverversingen per uur in de inhalatieapparatuur;

b) temperatuur en vochtigheid van de lucht;

c) nominale concentraties (de totale hoeveelheid teststof die de inhalatieapparatuur wordt binnengeleid, gedeeld door het luchtvolume);

d) aard van het eventuele medium;

e) feitelijke concentraties van de teststof in het ademhalingsgebied van de dieren;

f) mediaan van de deeltjesgrootte (in voorkomend geval);

— dosisniveaus (met het eventuele medium) en concentraties;

— gegevens over de tumorincidentie naar geslacht, dosis en type tumor;

— tijdstip gedurende het onderzoek waarop de dood intreedt of aangeven of dieren tot het eind van de proef in leven bleven;

— gegevens over de toxische reactie naar geslacht en dosis;

— beschrijving van toxische of andere effecten;

— tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en verloop hiervan;

— gegevens over voedsel en lichaamsgewicht;

— resultaten van hematologisch onderzoek;

— bevindingen van de necropsie;

— gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;

— statistische verwerking van de resultaten met een beschrijving van de gebruikte methoden;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. **LITERATUUR**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

GECOMBINEERDE CHRONISCHE TOXICITEIT/CARCINOGENITEITSTEST

1. METHODE

1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. Definities

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. Referentiestoffen

Geen.

1.4. Principe van de onderzoekmethode

Doel van een gecombineerd onderzoek naar de chronische toxiciteit en carcinogeniteit is, na langdurige en herhaalde blootstelling de chronische en carcinogene effecten van een stof bij een zoogdiersoort te bepalen.

Hiertoe worden de voor het carcinogeniteitsonderzoek gebruikte groepen aangevuld met ten minste een te behandelen satellietgroep en een controlesatellietgroep. De voor de satellietgroep met de hoogste dosis gebruikte dosis mag hoger zijn dan die welke voor de hoge dosisgroep in het carcinogeniteitsonderzoek wordt gebruikt. De dieren in het carcinogeniteitsonderzoek worden op algemene toxiciteit en carcinogene reactie onderzocht. De dieren in de behandelde satellietgroep worden onderzocht op algemene toxiciteit.

De teststof wordt normaal gesproken gedurende zeven dagen per week langs een geschikte toedieningsweg aan verscheidene groepen proefdieren gedurende het grootste deel van hun levensduur toegediend. Er wordt een dosis per groep gebruikt. Tijdens en na blootstelling aan de teststof worden de proefdieren dagelijks op tekenen van toxiciteit en zich ontwikkelende tumoren onderzocht.

1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

Voor het onderzoek worden de dieren gedurende ten minste vijf dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Voor het onderzoek worden gezonde, jonge dieren op willekeurige wijze in te behandelen en controlegroepen ingedeeld.

Proefdieren

Er wordt de voorkeur gegeven aan ratten. Op grond van de resultaten van eerder uitgevoerd onderzoek mogen ook andere diersoorten (knaagdieren of niet-knaagdieren) worden gebruikt. Er dient gebruik te worden gemaakt van stammen van jonge, gezonde dieren die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt en met de dosering dient zo spoedig mogelijk na het verspenen te worden begonnen.

Bij het begin van het onderzoek mag het gewicht van de dieren niet meer dan ± 20 % van het gemiddelde gewicht afwijken. Indien een studie naar de subchronische toxiciteit is uitgevoerd ter voorbereiding op een chronisch toxiciteitsonderzoek, dienen in beide studies dezelfde soort en stam te worden gebruikt.

Aantal en geslacht

Er dient gebruik te worden gemaakt van beide geslachten. Voor ieder dosisniveau en de parallelle controlegroep moeten ten minste 100 dieren (50 wijfjes en 50 mannetjes) worden gebruikt. De wijfjes moeten nulliparae zijn en mogen niet drachtig zijn. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal worden verhoogd met het aantal dieren dat volgens plan voor de voltooiing van de studie zal worden gedood.

De behandelde satellietgroep(en) voor de evaluatie van pathologische verschijnselen (behalve tumoren), moet(en) 20 dieren van elk geslacht omvatten, terwijl de satellietcontrolegroep tien dieren van elk geslacht dient te omvatten.

Dosisniveaus en frequentie van blootstelling

Voor carcinogeniteitstesten dienen, naast de parallelle controlegroep, ten minste drie dosisniveaus te worden gebruikt. Het hoogste dosisniveau moet leiden tot tekenen van minimale toxiciteit, zoals een lichte achteruitgang van de gewichtstoename (minder dan 10 %), zonder dat daardoor de normale levensduur van het dier als gevolg van andere effecten dan tumoren aanzienlijk wordt bekort.

Bij de laagste dosis mogen de normale groei, ontwikkeling en levensduur van het dier niet worden verstoord en mogen geen tekenen van toxiciteit optreden. In het algemeen dient deze dosis niet lager te zijn dan 10 % van de hoogste dosis.

De tussenliggende doses moeten worden gekozen in een gebied halverwege tussen de hoge en de lage dosis.

Bij de keuze van de dosisniveaus dient rekening te worden gehouden met de gegevens uit eerder uitgevoerd toxiciteitsonderzoek.

Voor het onderzoek naar de chronische toxiciteit worden nog andere behandelde groepen en een controlesatellietgroep bij het onderzoek betrokken. De hoge dosis voor de dieren in de behandelde satellietgroep dient zo te worden gekozen dat er duidelijke tekenen van toxiciteit optreden.

De frequentie van de blootstelling is normaliter dagelijks. Indien de teststof in het drinkwater wordt toegediend of met het voer wordt gemengd, dient dit steeds beschikbaar te zijn.

Controlegroepen

Er dient gebruik te worden gemaakt van een parallelle controlegroep die, afgezien van de blootstelling aan de teststof, in elk opzicht identiek is aan de behandelde groepen.

In speciale omstandigheden, zoals bij inhalatiestudies met aërosolen of het gebruik van een emulgator met onbekende biologische activiteit via de orale weg, dient ook een aanvullende controlegroep te worden gebruikt die niet aan het medium wordt blootgesteld.

Toedieningsweg

De drie belangrijkste toedieningswegen zijn de orale, de dermale en de inhalatieweg. De keuze van de toedieningsweg hangt af van de fysische en chemische eigenschappen van de teststof en de meest waarschijnlijke blootstellingsroute bij de mens.

Orale studies

Indien de teststof in het maag-darmkanaal wordt geresorbeerd en de blootstelling van de mens onder meer langs de orale weg geschiedt, verdient orale toediening de voorkeur, tenzij er contra-indicaties zijn. De dieren moeten de teststof toegediend krijgen in hun voedsel, opgelost in het drinkwater of via capsules. In het ideale geval dient de dosis zeven dagen per week dagelijks te worden toegediend, omdat bij dosering gedurende vijf dagen per week het dier zich in de tijd dat geen dosis wordt toegediend, eventueel herstelt of de toxiciteitsverschijnselen verdwijnen, waardoor de resultaten en de evaluatie daarvan kunnen worden beïnvloed. Voornamelijk uit praktische overwegingen echter wordt dosering gedurende vijf dagen per week aanvaardbaar geacht.

Dermale studies

Dermale blootstelling door het aanbrengen van de teststof op de huid kan worden gekozen om een belangrijke blootstellingsroute bij de mens na te bootsen en als model voor de inductie van huidletsels.

Inhalatiestudies

Aangezien bij inhalatiestudies de technische problemen ingewikkelder zijn dan bij andere toedieningswegen het geval is, volgen hieronder meer gedetailleerde aanwijzingen met betrekking tot deze wijze van toediening. Intratracheale instillatie is in specifieke omstandigheden wellicht een deugdelijk alternatief.

Bij chronische blootstellingen baseert men zich gewoonlijk op de verwachte praktijkomstandigheden in de industrie, in welk geval de dieren vijf dagen per week gedurende zes uur na het bereiken van de juiste concentratie in de blootstellingskamer worden blootgesteld (onderbroken blootstelling), of op een mogelijke expositie in het milieu, in welk geval de dieren zeven dagen per week gedurende 22 tot 24 uur per dag worden blootgesteld (continue blootstelling), met ongeveer een uur voor het voederen van de dieren (iedere dag op dezelfde tijd) en het schoonmaken van de kamers. In beide gevallen worden de dieren doorgaans blootgesteld aan een vaste concentratie van teststoffen. Een belangrijk verschil tussen onderbroken en continue blootstelling is dat er bij de eerste een periode van zeventien tot achttien uur is, waarin de dieren zich van de effecten van elke dagelijkse expositie kunnen herstellen; gedurende de weekeinden is deze herstelperiode nog langer.

De keuze tussen onderbroken of continue blootstelling hangt af van de doeleinden van het onderzoek en van de na te bootsen blootstellingsomstandigheden bij de mens. Bepaalde technische moeilijkheden verdienen echter de aandacht. Zo kunnen bij voorbeeld de voordelen van continue blootstelling bij het nabootsen van de milieucondities wegvallen in verband met de noodzaak de dieren tijdens de blootstelling te eten en te drinken te geven, en de behoefte aan meer gecompliceerde en betrouwbare aërosol- en gasgeneratietechnieken en meettechnieken.

Blootstellingskamers

De dieren worden aan de teststoffen blootgesteld in inhalatiekamers die zodanig gebouwd moeten zijn dat kan worden gezorgd voor een dynamische luchtdoorstroming van ten minste twaalf luchtverversingen per uur, een toereikend zuurstofgehalte en een gelijkmatige verdeling van de teststof in de atmosfeer. De controle- en blootstellingskamers moeten qua structuur identiek zijn, zodat, behalve waar het de blootstelling aan de teststoffen betreft, in alle opzichten vergelijkbare blootstellingsomstandigheden gewaarborgd zijn. Binnen in de kamer wordt over het algemeen een geringe onderdruk gehandhaafd om te voorkomen dat de teststof naar buiten lekt. De kamers dienen zodanig te zijn ontworpen dat de dieren elkaar zo min mogelijk verdringen. Als algemene regel voor het verzekeren van een stabiele atmosfeer in de blootstellingskamer geldt dat het totale volume van de proefdieren niet meer mag bedragen dan 5 % van het volume van de kamer.

De volgende parameters moeten worden gemeten of gecontroleerd:

i) Luchtdoorstroming: het aantal luchtverversingen per uur in de kamer dient bij voorkeur continu te worden gemeten.

ii) Tijdens de dagelijkse blootstelling mag de concentratie met niet meer dan ± 15 % van het gemiddelde afwijken. Tijdens de gehele duur van de studie moeten de dagelijkse concentraties zo constant mogelijk worden gehouden.

iii) Temperatuur en vochtigheid: voor knaagdieren dient de temperatuur op 22 °C (± 2 °C) en de vochtigheid in de kamer op 30 tot 70 % te worden gehouden, behalve wanneer water wordt gebruikt om de teststof in de atmosfeer van de blootstellingskamer te verstuiven. Beide waarden dienen bij voorkeur continu te worden gemeten.

iv) Metingen van de deeltjesgrootte: wanneer de atmosfeer vloeibare of vaste aërosolen bevat, dient de verdeling van de deeltjesgrootte te worden bepaald. De aërosoldeeltjes dienen een zodanige afmeting te hebben dat zij voor de gebruikte proefdieren in te ademen zijn. Monsters van de atmosfeer dienen te worden genomen op ademhalingshoogte van de dieren. Het luchtmonster dient representatief te zijn voor de verdeling van de deeltjes waaraan de dieren zijn blootgesteld en dient, op gravimetrische basis, alle gesuspendeerde aërosoldeeltjes te bevatten, zelfs wanneer een groot gedeelte van de aërosoldeeltjes niet in te ademen is. Gedurende de werking van de apparatuur voor de verstuiving van deeltjes moeten regelmatig analyses worden uitgevoerd van de deeltjesgrootte, ten einde de stabiliteit van de aërosol na te gaan, en daarna tijdens de blootstelling zo vaak als nodig is om de stabiliteit van de verdeling van de deeltjesgrootte waaraan de dieren zijn blootgesteld, te bepalen.

Duur van het onderzoek

Het gedeelte van het onderzoek dat betrekking heeft op de carcinogeniteit, beslaat het grootste deel van de normale levensduur van de proefdieren. Het onderzoek dient te worden beëindigd na achttien maanden voor muizen en hamsters en 24 maanden voor ratten; voor bepaalde dierstammen met een langere levensduur en/of een laag percentage spontane tumoren dient de studie te worden beëindigd na 24 maanden voor muizen en hamsters en na 30 maanden voor ratten. Een dergelijk uitgebreid onderzoek mag evenwel worden beëindigd wanneer het aantal overlevende dieren in de groep met de laagste dosis of in de controlegroep 25 % bedraagt. Indien blijkt dat de geslachten duidelijk verschillend reageren, dienen de geslachten afzonderlijk te worden beschouwd. Als alleen dieren in de groep met de hoogste dosis voortijdig sterven en dit duidelijk aan toxiciteit te wijten is, betekent dit niet dat de studie moet worden beëindigd, mits de toxische verschijnselen bij de andere groepen geen problemen opleveren. Wil een negatief testresultaat aanvaardbaar zijn, dan mag niet meer dan 10 % van een groep voor het experiment verloren gaan als gevolg van autolyse, kannibalisme of huisvestingsproblemen, en moet het percentage overlevende dieren in alle groepen na achttien maanden voor muizen en hamsters en na 24 maanden voor ratten ten minste 50 % bedragen.

De satellietgroepen van 20 behandelde dieren per geslacht en de tien controledieren per geslacht die worden gebruikt voor de chronische toxiciteitstests, dienen ten minste twaalf maanden te worden onderzocht. Deze dieren dienen te worden gedood met het oog op een beoordeling van de door de teststof veroorzaakte pathologie, waarbij geriatrische veranderingen geen rol mogen spelen.

Uitvoering

Waarnemingen

De dieren moeten dagelijks in hun kooien worden geobserveerd. Daarbij dient aandacht te worden geschonken aan veranderingen in huid en vacht, ogen en slijmvliezen, alsmede ademhaling, bloedsomloop, het autonome en centrale zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag.

Op gezette tijden dienen de dieren in de behandelde satellietgroep(en) klinisch te worden onderzocht.

De dieren moeten regelmatig worden geobserveerd om te voorkomen dat zij voor het onderzoek verloren gaan als gevolg van oorzaken als kannibalisme, autolyse van weefsels of het op verkeerde wijze in kooien stoppen. Indien stervende dieren worden aangetroffen, dienen deze te worden verwijderd; op hen wordt necropsie verricht.

Voor alle dieren moeten de klinische tekenen, inclusief neurologische en oculaire veranderingen, alsmede de sterfte worden vastgelegd. Bijzondere aandacht moet worden besteed aan zich ontwikkelende tumoren; het tijdstip waarop toxische verschijnselen voor het eerst optreden, en het verloop ervan dienen te worden opgetekend; van elke met het blote oog zichtbare of voelbare tumor moeten het tijdstip waarop deze voor het eerst is opgetreden, de plaats, de afmetingen, het uiterlijk en het verloop worden opgetekend.

Het verbruik van voer (en water wanneer de teststof in het drinkwater wordt toegediend) dient gedurende de eerste dertien weken van het onderzoek wekelijks te worden gemeten en vervolgens ongeveer om de drie maanden, tenzij wijzigingen in de gezondheidstoestand of het lichaamsgewicht van het dier anders voorschrijven.

Gedurende de eerste dertien weken van het onderzoek dient het lichaamsgewicht voor elk dier afzonderlijk eens per week te worden vastgelegd; daarna ten minste om de vier weken.

Klinisch onderzoek

Hematologie

Een hematologisch onderzoek (bij voorbeeld hemoglobinegehalte, hematocriet, totaal aantal rode bloedlichaampjes, totaal aantal witte bloedlichaampjes, bloedplaatjes of andere metingen van de stollingseigenschappen) dient te worden verricht na drie maanden, zes maanden en vervolgens om de zes maanden en aan het eind van het onderzoek op bloedmonsters van tien ratten per geslacht uit alle groepen. Indien mogelijk dienen deze monsters telkens afkomstig te zijn van dezelfde ratten.

Indien op grond van de observatie van de dieren in de kooien wordt vermoed dat de gezondheidstoestand van de dieren tijdens het onderzoek achteruitgaat, dient bij de betrokken dieren een differentiële telling van bloedcellen te worden uitgevoerd.

Een differentiële telling van bloedcellen wordt uitgevoerd op monsters afkomstig van de dieren in de hoogste dosisgroep en de controlegroep. Bij de daaropvolgende lagere groep(en) worden alleen differentiële tellingen van bloedcellen verricht als er tussen de hoogste groep en de controlegroepen een groot verschil bestaat of als daartoe op grond van het pathologisch onderzoek een indicatie wordt gegeven.

Urineonderzoek

Er dienen unrinemonsters te worden genomen van tien ratten per geslacht uit alle groepen, indien mogelijk met dezelfde tussenpozen als bij het bloedonderzoek hierboven. In het geval van knaagdieren dienen bij de afzonderlijke dieren of op een samengevoegd monster per geslacht per groep de volgende bepalingen te worden verricht:

— uiterlijk: volume en dichtheid voor de afzonderlijke dieren;

— eiwit, glucose, ketonen, occult bloed (semi-kwantitatief);

en

— microscopie van sediment (semi-kwantitatief).

Klinische biochemie

Ongeveer om de zes maanden en aan het eind van het onderzoek worden bloedmonsters voor klinisch-biochemische metingen genomen bij alle niet-knaagdieren en bij tien ratten per geslacht uit alle groepen, indien mogelijk steeds bij dezelfde ratten. Bij niet-knaagdieren dient bovendien voor het onderzoek een monster te worden genomen. Uit deze monsters wordt het plasma bereid waarop de volgende bepalingen worden verricht:

— totaal eiwitgehalte;

— albuminegehalte;

— leverfunctietesten (zoals alkalische fosfataseactiviteit, glutamaatpyruvaattransaminase(1)activiteit en glutamaatoxaalacetaattransaminase(2)activiteit), gammaglutamyltranspeptidase, ornithinedecarboxylase;

— koolhydraatstofwisseling, zoals nuchter glucosegehalte van het bloed;

— nierfunctietesten zoals ureumstikstof in het bloed.

(1) Thans bekend als serumalanineaminotransferase.
(2) Thans bekend als serumaspartaataminotransferase.

Macroscopische necropsie

Op alle dieren, ook die welke tijdens het experiment stierven of gedood werden toen zij stervende waren, moet een volledig macroscopisch onderzoek worden verricht. Van alle dieren moet, voordat zij gedood worden, een bloedmonster worden genomen voor differentiële tellingen van bloedcellen. Alle met het blote oog zichtbare tumoren of letsels waarvan wordt aangenomen dat het tumoren zijn, dienen te worden bewaard. Getracht moet worden om de macroscopische waarnemingen te correleren aan de microscopische bevindingen.

Alle organen en weefsels dienen voor microscopisch onderzoek te worden bewaard. Gewoonlijk zijn dat de organen en weefsels: hersenen (1) (medulla/pons, cortex cerebelli, cortex cerebri), hypofyse, schildklier (met bijschildklieren), thymus, longen (met luchtpijp), hart, aorta, speekselklieren, lever (1), milt, nieren (1), bijnieren (1), slokdarm, maag, duodenum, jejunum, ileum, blinde darm, colon, rectum, uterus, urineblaas, lymfklieren, alvleesklier, geslachtsklieren (1), secundaire geslachtsorganen, vrouwelijke borstklier, huid, spieren, perifere zenuwen, ruggemerg (cervicaal, thoracaal, lumbaal), borstbeen met beenmerg, dijbeen (met gewricht) en ogen.

Vullen van de longen en urineblaas met een fixatief is de beste manier om deze weefsels te bewaren. Bij inhalatiestudies is het vullen van de longen van wezenlijk belang voor een goed histopathologisch onderzoek. Bij speciale studies zoals inhalatiestudies dient de gehele tractus respiratorius te worden onderzocht, met inbegrip van neus, pharynx en larynx.

Indien nog ander klinisch onderzoek wordt verricht, dient de daaruit verkregen informatie voor het microscopisch onderzoek beschikbaar te zijn, omdat dit voor de patholoog belangrijke aanwijzingen kan bevatten.

Histopathologie

Voor het gedeelte van het onderzoek dat betrekking heeft op de chronische toxiciteit:

Alle bewaarde organen van alle dieren uit de satellietgroep met de hoge dosis en de controlegroep moeten uitvoerig worden onderzocht. Als in de satellietgroep met de hoogste dosis sprake is van pathologische verschijnselen die door de teststof worden veroorzaakt, moeten de aangetaste organen van alle andere dieren in alle andere behandelde satellietgroepen en die uit de behandelde groepen in het gedeelte van het onderzoek dat op de carcinogeniteit betrekking heeft, aan het eind van het onderzoek aan een volledig en uitvoerig histologisch onderzoek worden onderworpen.

Voor het gedeelte van het onderzoek dat betrekking heeft op de carcinogeniteit:

a) Er dient een volledig histopathologisch onderzoek te worden uitgevoerd op de organen en weefsels van alle dieren die tijdens het onderzoek sterven of worden gedood, en alle dieren uit de controlegroepen en de groep met de hoge dosis.

b) Bij alle groepen moeten alle, in enig orgaan voorkomende, met het blote oog zichtbare tumoren of letsels waarvan wordt vermoed dat het tumoren zijn, worden onderzocht.

c) Indien er tussen de hoge-dosisgroep en de controlegroepen een aanzienlijk verschil bestaat in de incidentie van neoplastische letsels, dient een histopathologisch onderzoek te worden verricht op het orgaan of weefsel in kwestie bij de andere dosisgroepen.

d) Als het aantal overlevende dieren in de groep met de hoogste dosis aanmerkelijk kleiner is dan in de controlegroep, moet de eerstvolgende lagere dosisgroep volledig worden onderzocht.

e) Indien bij de hoogste dosisgroep blijkt dat er toxische of andere effecten geïnduceerd worden die van invloed zouden kunnen zijn op de neoplastische respons, dan dient de eerstvolgende lagere dosisgroep volledig te worden onderzocht.

2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het aantal dieren waarbij tijdens het onderzoek tumoren of toxische effecten zijn ontdekt, het tijdstip waarop deze zijn ontdekt, en het aantal dieren waarbij, nadat deze zijn gedood, tumoren zijn aangetroffen. De resultaten moeten met behulp van een voor dit doel geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

3. VERSLAGGEVING

3.1. Verslag van de proefnemingen

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

— diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voer, enzovoort;

(1) Deze organen, afkomstig van tien dieren per geslacht per groep voor knaagdieren, dienen te worden gewogen.

— proefomstandigheden:

Beschrijving van de blootstellingsapparatuur:

Met inbegrip van ontwerp, type, afmetingen, luchtbron, systeem voor het bereiden van stof- en vloeistofaërosolen, methode voor het conditioneren van de lucht, behandeling van de afgewerkte lucht en wijze waarop de dieren tijdens de proeven in een blootstellingskamer zijn ondergebracht als deze wordt gebruikt. Er moet een beschrijving worden gegeven van de apparatuur voor het meten van de temperatuur, de vochtigheid en, in voorkomend geval, de stabiliteit van de concentratie en de deeltjesgrootte van de aërosolen.

Gegevens betreffende de blootstelling:

Deze moeten in tabelvorm worden gerangschikt en worden voorzien van gemiddelde waarden en een maat voor de variabiliteit (bij voorbeeld standaarddeviatie). Ze dienen te omvatten:

a) het aantal luchtverversingen per uur in de inhalatieapparatuur;

b) temperatuur en vochtigheid van de lucht;

c) nominale concentraties (de totale hoeveelheid teststof die de inhalatieapparatuur wordt binnengeleid, gedeeld door het luchtvolume);

d) aard van het eventuele medium;

e) feitelijke concentraties van de teststof in het ademhalingsgebied van de dieren;

f) mediaan van de deeltjesgrootte (in voorkomend geval).

— dosisniveaus (met het eventuele medium) en concentraties;

— gegevens over de tumorincidentie naar geslacht, dosis en type tumor;

— tijdstip gedurende het onderzoek waarop de dood intreedt of aangeven of dieren tot het eind van de proef in leven bleven (ook voor de satellietgroep);

— gegevens over de toxische reactie naar geslacht en dosis;

— beschrijving van toxische of andere effecten;

— tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en verloop hiervan;

— oftalmologische bevindingen;

— gegevens over voedsel en lichaamsgewicht;

— resultaten van hematologisch onderzoek;

— resultaten van klinisch-biochemisch onderzoek (resultaten van het urineonderzoek inbegrepen);

— bevindingen van de necropsie;

— gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;

— statistische verwerking van de resultaten met een beschrijving van de gebruikte methoden;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. **LITERATUUR**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

REPRODUKTIETOXICITEITSONDERZOEK OVER ÉÉN GENERATIE

1. METHODE

1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. Definities

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. Referentiestoffen

Geen.

1.4. Principe van de onderzoekmethode

De teststof wordt in geleidelijk stijgende doseringen aan verscheidene groepen mannelijke en vrouwelijke dieren toegediend. Aan de mannetjes dient de teststof gedurende de groei en gedurende ten minste één volledige spermatogene cyclus (ongeveer 56 dagen bij de muis en 70 dagen bij de rat) toegediend te worden, ten einde eventuele, door de teststof veroorzaakte nadelige effecten op de spermatogenese aan het licht te brengen.

Aan de vrouwelijke ouderdieren (P-generatie) moet de teststof ten minste gedurende twee volledige oestruscycli worden toegediend, ten einde eventuele door de teststof veroorzaakte nadelige effecten op de oestrus aan het licht te brengen. Vervolgens laat men de dieren paren. Gedurende de paartijd wordt de teststof aan beide geslachten toegediend; daarna alleen aan de wijfjes gedurende de dracht en de zoogtijd. Bij toediening van de teststof via inhalatie zal de methode op een aantal punten moeten worden aangepast.

1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

Voorbereidingen

Voor het onderzoek worden gezonde, jonge dieren op willekeurige wijze in de te behandelen en controlegroepen ingedeeld. Voor het onderzoek worden de dieren ten minste vijf dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Aanbevolen wordt de teststof in het voedsel of drinkwater toe te dienen. Ook andere toedieningswegen komen in aanmerking. De teststof moet bij alle dieren voor de gehele duur van het experiment op dezelfde manier worden toegediend. Indien een medium of andere additieven worden gebruikt om de dosering te vergemakkelijken, moet ervan bekend zijn dat zij geen toxische effecten veroorzaken.

Toediening geschiedt gedurende zeven dagen per week.

Proefdieren

Selectie van de soort

Er wordt de voorkeur gegeven aan ratten of muizen. Stammen met een lage vruchtbaarheid dienen niet te worden gebruikt. Er dient gebruik te worden gemaakt van gezonde dieren die nog niet eerder aan experimenten zijn onderworpen. Van de proefdieren dienen soort, stam, geslacht, gewicht en/of leeftijd bekend te zijn.

Voor een juiste beoordeling van de vruchtbaarheid dienen zowel de mannetjes als de wijfjes te worden onderzocht. Alle behandelde en controledieren dienen gespeend te zijn voordat met de dosering wordt begonnen.

Aantal en geslacht

Elke behandelde en controlegroep dient zoveel dieren te bevatten dat er steeds ongeveer 20 drachtige wijfjes zijn die op ongeveer hetzelfde tijdstip verwacht worden te werpen.

Dit om te komen tot voldoende drachten en nakomelingen om een zinvolle evaluatie te kunnen maken van de mogelijke effecten van de stof op de vruchtbaarheid, de dracht en het gedrag van de moeder bij de dieren van de oudergeneratie en het zogen, de groei en de ontwikkeling van de F_1-generatie vanaf de conceptie tot aan de spening.

Proefomstandigheden

Voer en water dienen ad libitum te worden verstrekt. Vlak voor de partus moeten de drachtige wijfjes apart in speciale hokken worden ondergebracht; eventueel kan nestmateriaal worden verstrekt.

Dosisniveaus

Er dienen ten minste drie dosisgroepen en een controlegroep te worden gebruikt. Indien bij de toediening van de teststof van een medium gebruik wordt gemaakt, dient dit aan de controlegroep in het hoogste gebruikte volume toegediend te worden. Indien een teststof leidt tot een verminderde voeropname of -absorptie, dan kan het noodzakelijk zijn een parallelle controlegroep te gebruiken. In het ideale geval moet het hoogste dosisniveau bij de ouderdieren leiden tot toxische verschijnselen, maar niet tot sterfte, tenzij zulks op grond van de fysisch-chemische eigenschappen of de biologische effecten van de teststof onmogelijk is. In het ideale geval moeten de tussenliggende doses leiden tot minimale toxische effecten die aan de teststof zijn toe te schrijven, en mag de lage dosis niet tot enige waarneembare nadelige effecten bij de ouders of de nakomelingen leiden. Wanneer de teststof via een maagsonde of in capsules wordt toegediend, moet de aan elk dier toegediende dosis gebaseerd zijn op het lichaamsgewicht van het dier en wekelijks aan het gewijzigde lichaamsgewicht worden aangepast. Bij drachtige wijfjes kan de dosis desgewenst gebaseerd worden op het lichaamsgewicht op dag nul of dag zes van de dracht.

Hoogste te testen dosis

Indien stoffen met een lage toxiciteit bij een dosisniveau van ten minste 1 000 mg/kg het voortplantingsvermogen op generlei wijze blijkt te zijn verstoord, zijn studies bij andere dosisniveaus wellicht niet noodzakelijk. Indien uit een voorafgaand onderzoek bij het hoge dosisniveau waarbij duidelijke tekenen van toxiciteit bij het moederdier voorkomen geen nadelige effecten op de vruchtbaarheid blijken, zijn studies bij andere dosisniveaus wellicht niet noodzakelijk.

Uitvoering van het onderzoek

Tijdschema

Met de dagelijkse toediening van de teststof aan de mannelijke ouderdieren dient te worden begonnen wanneer deze vijf à negen weken oud zijn, nadat zij zijn gespeend en gedurende ten minste vijf dagen aan de proefomstandigheden zijn gewend. Bij ratten wordt de teststof gedurende tien weken vóór de paartijd toegediend (bij muizen gedurende acht weken). De mannetjes kunnen hetzij aan het einde van de paartijd worden gedood en onderzocht, hetzij op hun voer met de teststof in leven worden gehouden voor de eventuele voortbrenging van een tweede nest en dan enige tijd voor het eind van het onderzoek worden gedood en onderzocht. Bij vrouwelijke ouderdieren dient met de dosering na ten minste vijf dagen van gewenning aan de proefomstandigheden te worden begonnen en deze dient ten minste twee weken te hebben geduurd vóór de paring plaatsvindt. De dagelijkse toediening van de teststof aan de vrouwelijke ouderdieren dient te worden voortgezet gedurende de hele paringstijd van drie weken, de dracht en tot aan het spenen van de nakomelingen van de eerste generatie. Er dient aandacht te worden geschonken aan wijzigingen in het doseringsschema op grond van andere beschikbare informatie over de teststof, zoals inductie van het teststofmetabolisme of bioaccumulatie.

Paring

Bij studies naar de reproduktietoxiciteit kan men hetzij één mannetje met één wijfje (1:1) of één mannetje met twee wijfjes (1:2) laten paren.

In het eerste geval (1:1) wordt één wijfje bij hetzelfde mannetje geplaatst totdat het drachtig is of er drie weken zijn verstreken. Elke ochtend worden de wijfjes onderzocht op de aanwezigheid van sperma of vaginale plugs. Dag nul van de dracht is de dag waarop een vaginale plug of sperma wordt aangetroffen, waarbij rekening wordt gehouden met de spermatogenese.

Bij de paartjes waarbij de paring mislukt, dient te worden nagegaan wat de oorzaak van deze kennelijke onvruchtbaarheid is. Dit kan onder meer geschieden door de dieren nogmaals te laten paren, maar dan met vader- of moederdieren van bewezen vruchtbaarheid, door microscopisch onderzoek van de voortplantingsorganen en onderzoek van de oestruscyclus of de spermatogenese.

Nestgrootte

De dieren waaraan gedurende het vruchtbaarheidsonderzoek de teststof wordt toegediend, worden in de gelegenheid gesteld normaal te werpen en hun jongen tot de speentijd groot te brengen. De nestgrootte wordt hierbij niet gestandaardiseerd.

Als standaardisatie wel gebeurt, dan wordt voorgesteld als volgt tewerk te gaan. Tussen de eerste en de vierde dag na de geboorte kan de grootte van elk nest worden aangepast door het teveel aan jongen, via selectie, uit het nest te nemen om uiteindelijk vier mannetjes en vier wijfjes per nest over te houden.

Indien het aantal mannetjes of wijfjes niet voldoende is om er per nest vier van elk geslacht over te houden, kan worden volstaan met een gedeeltelijke aanpassing (bij voorbeeld vijf mannetjes en drie wijfjes). Een en ander is niet van toepassing op nesten met minder dan acht jongen.

Waarnemingen

Gedurende de hele onderzoekperiode wordt elk dier ten minste eenmaal per dag geobserveerd. Met de teststof samenhangende veranderingen in het gedrag, tekenen van een moeilijke of langdurige geboorte en alle tekenen van toxiciteit, inclusief sterfte, dienen te worden vastgelegd. Gedurende de tijd die aan de paring voorafgaat en de paartijd dient het verbruik van voer wekelijks te worden gemeten. Tijdens de dracht kan het verbruik van voer eventueel dagelijks worden gemeten. Na het werpen en tijdens de zoogtijd dient het verbruik van voer (en van water indien de teststof met het drinkwater wordt toegediend) te worden gemeten op dezelfde dag als de nesten worden gewogen. De mannelijke en vrouwelijke ouderdieren moeten worden gewogen op de eerste dag dat zij de teststof krijgen toegediend en daarna eenmaal per week. Deze waarnemingen moeten voor elk volwassen dier afzonderlijk worden vastgelegd.

De drachttijd dient te worden berekend vanaf dag nul van de dracht. Elke worp dient zo spoedig mogelijk na de geboorte te worden onderzocht, ten einde het aantal en geslacht van de jongen vast te stellen, alsmede het aantal dood- en levendgeboren jongen en de aanwezigheid van met het blote oog zichtbare afwijkingen.

Dode jongen en jongen die op de vierde dag worden gedood, dienen te worden bewaard en op eventuele afwijkingen te worden onderzocht. De levende jongen moeten worden geteld en de nesten moeten worden gewogen op de ochtend na de geboorte, op de vierde en de zevende dag en vervolgens wekelijks tot het eind van het onderzoek, wanneer de dieren afzonderlijk dienen te worden gewogen. De bij de moederdieren en nakomelingen waargenomen lichamelijke of gedragsafwijkingen dienen te worden opgetekend.

Pathologie

Necropsie

Wanneer er ouderdieren tijdens het onderzoek worden gedood of sterven, dienen zij macroscopisch te worden onderzocht op eventuele structurele afwijkingen of pathologische veranderingen, waarbij speciaal aandacht moet worden geschonken aan de voortplantingsorganen. Dode of stervende jongen moeten op afwijkingen worden onderzocht.

Histopathologie

Van alle ouderdieren moeten de eierstokken, uterus, cervix, vagina, testes, epididymides, zaadblaasjes, prostaat, coagulans afscheidende klier, de hypofyse en aangetaste organen voor microscopisch onderzoek worden bewaard. In het geval dat deze organen nog niet bij andere onderzoeken, waarbij herhaalde doseringen zijn toegediend, zijn onderzocht, dienen zij microscopisch te worden onderzocht bij alle dieren uit de hoogste dosisgroep en de controlegroep en de dieren die tijdens het onderzoek sterven.

De organen die bij deze dieren afwijkingen vertonen, dienen vervolgens bij alle andere ouderdieren te worden onderzocht. In deze gevallen dienen alle weefsels die met het blote oog zichtbare pathologische veranderingen vertonen, microscopisch te worden onderzocht. Zoals hierboven reeds werd gesuggereerd, kunnen de voortplantingsorganen van dieren waarvan wordt vermoed dat zij onvruchtbaar zijn, aan een microscopisch onderzoek worden onderworpen.

2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het aantal vruchtbare mannetjes, het aantal drachtige wijfjes, de aard van de veranderingen en het percentage dieren dat elk type verandering vertoont.

Indien mogelijk, moeten alle numerieke resultaten met behulp van een voor dit doel geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere algemeen erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

3. VERSLAGGEVING

3.1. Verslag van de proefnemingen

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

— gebruikte diersoort/stam;

— gegevens over de toxische reactie naar geslacht en dosis, met inbegrip van vruchtbaarheid, dracht en levensvatbaarheid;

— tijdstip gedurende het onderzoek waarop de dood intreedt of aangeven of dieren tot de tijd waarop zij volgens plan zouden worden gedood of tot het einde van de proef in leven bleven;

— tabel met het gewicht van elke worp, het gemiddelde gewicht van de jongen en het gewicht van elk jong afzonderlijk aan het eind van het onderzoek;

— toxische of andere effecten op de reproduktie, het nageslacht, postnatale groei, enzovoort;

— dag waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en verloop hiervan;

— gegevens over het lichaamsgewicht van de ouderdieren;

— bevindingen van de necropsie;

— gedetailleerde beschrijving van eventuele microscopische bevindingen;

— statistische verwerking van de resultaten, waar dat van toepassing is;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. **LITERATUUR**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

REPRODUKTIETOXICITEITSONDERZOEK OVER TWEE GENERATIES

1. METHODE

1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. Definities

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. Referentiestoffen

Geen.

1.4. Principe van de onderzoekmethode

De teststof wordt in geleidelijk stijgende doseringen aan verscheidene groepen mannelijke en vrouwelijke proefdieren toegediend. Aan de mannelijke ouderdieren (P-generatie) dient de teststof te worden toegediend gedurende de groei en gedurende ten minste één volledige spermatogene cyclus (ongeveer 56 dagen bij de muis en 70 dagen bij de rat), ten einde eventuele door de teststof veroorzaakte nadelige effecten op de spermatogenese aan het licht te brengen. Aan de vrouwelijke ouderdieren (P-generatie) moet de teststof gedurende ten minste twee volledige oestruscycli worden toegediend, ten einde eventuele door de teststof veroorzaakte nadelige effecten op de oestrus aan het licht te brengen. Na het spenen van de F_1-generatie wordt de toediening van de teststof bij deze nakomelingen voortgezet en wel gedurende de groei tot aan hun volwassenheid, gedurende de paring en de voortbrenging van een tweede generatie tot het tijdstip waarop de tweede generatie wordt gespeend. Bij toediening van de teststof via inhalatie zal de methode op een aantal punten moeten worden aangepast.

1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

Voorbereidingen

Voor het onderzoek worden gezonde dieren op willekeurige wijze in te behandelen en controlegroepen ingedeeld. Voor het onderzoek worden de ouderdieren gedurende ten minste vijf dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Aanbevolen wordt de teststof in het voedsel of drinkwater toe te dienen. Ook andere toedieningswegen komen in aanmerking. De teststof moet bij alle dieren voor de gehele duur van het experiment op dezelfde manier worden toegediend. Indien een medium of andere additieven worden gebruikt om de dosering te vergemakkelijken, moet ervan bekend zijn dat zij geen toxische effecten veroorzaken. Toediening geschiedt gedurende zeven dagen per week.

Proefdieren: Selectie van de soort

Er wordt de voorkeur gegeven aan ratten of muizen.

Stammen met een lage vruchtbaarheid dienen niet te worden gebruikt. Er dient gebruik te worden gemaakt van gezonde ouderdieren die nog niet eerder aan experimenten zijn onderworpen. Van de proefdieren dienen soort, stam, geslacht, gewicht en/of leeftijd bekend te zijn.

Voor een juiste beoordeling van de vruchtbaarheid dienen zowel de mannetjes als de wijfjes te worden onderzocht. Alle behandelde en controledieren dienen gespeend te zijn voordat met de dosering wordt begonnen.

Aantal en geslacht

Elke behandelde en controlegroep dient zoveel dieren te bevatten dat er steeds ongeveer 20 drachtige wijfjes zijn die op ongeveer hetzelfde tijdstip verwacht worden te werpen. Dit om te komen tot voldoende drachten en nakomelingen om een zinvolle evaluatie te kunnen maken van de mogelijke effecten van de teststof op de

vruchtbaarheid, de dracht en het gedrag van de moeder, het zogen, de groei en de ontwikkeling van de F_1-generatie vanaf de conceptie tot aan de geslachtsrijpheid, alsmede de ontwikkeling van de tweede generatie tot aan het spenen.

Proefomstandigheden

Voer en water dienen ad libitum te worden verstrekt. Vlak voor de partus moeten de drachtige wijfjes apart in speciale kooien worden ondergebracht; eventueel kan nestmateriaal worden verstrekt.

Dosisniveaus

Er moeten ten minste drie dosisgroepen en een controlegroep worden gebruikt. Indien bij de toediening van de teststof van een medium gebruik wordt gemaakt, dient dit aan de controlegroep in het hoogste gebruikte volume toegediend te worden. Indien een teststof leidt tot een verminderde voeropname of -absorptie, kan het gebruik van een parallelle controlegroep nodig zijn. In het ideale geval dient het hoogste dosisniveau bij de ouderdieren te leiden tot toxische verschijnselen, maar niet tot sterfte, tenzij zulks op grond van de fysisch-chemische eigenschappen of de biologische effecten van de teststof niet mogelijk is. In het ideale geval dienen de tussenliggende doses te leiden tot minimale aan de teststof toe te schrijven effecten en dient de laagste dosis bij de ouderdieren of de nakomelingen niet tot enige waarneembare nadelige effecten te leiden. Wanneer de teststof via een maagsonde of in capsules wordt toegediend, moet de aan elk dier toegediende dosis gebaseerd zijn op het lichaamsgewicht van het dier en wekelijks worden aangepast. Bij drachtige wijfjes kan de dosis desgewenst worden gebaseerd op het lichaamsgewicht op dag nul of dag zes van de dracht.

Hoogste te testen dosis

Indien bij stoffen met een lage toxiciteit bij een dosisniveau van ten minste 1 000 mg/kg het voortplantingsvermogen op generlei wijze blijkt te zijn verstoord, zijn studies bij andere dosisniveaus wellicht niet noodzakelijk. Indien uit een vorige studie bij het hoge dosisniveau waarbij duidelijke tekenen van toxiciteit bij het moederdier voorkomen geen nadelige effecten op de vruchtbaarheid blijken, zijn studies bij andere dosisniveaus wellicht niet noodzakelijk.

Uitvoering van het onderzoek

Tijdschema

Met de dagelijkse toediening van de teststof aan de mannelijke ouderdieren dient te worden begonnen wanneer deze vijf à negen weken oud zijn, nadat zij zijn gespeend en gedurende ten minste vijf dagen aan de proefomstandigheden zijn gewend. Bij ratten wordt de teststof gedurende tien weken vóór de paartijd toegediend (bij muizen gedurende acht weken). De mannetjes kunnen aan het eind van de paartijd worden gedood en onderzocht, of op hun voer met de teststof in leven worden gehouden voor de eventuele voortbrenging van een tweede nest en dan enige tijd voor het eind van het onderzoek worden gedood en onderzocht.

Bij vrouwelijke ouderdieren dient met de dosering na ten minste vijf dagen van gewenning aan de proefomstandigheden te worden begonnen en deze dient ten minste twee weken te hebben geduurd vóór de paring plaatsvindt. De dagelijkse toediening van de teststof aan de vrouwelijke ouderdieren dient te worden voortgezet gedurende de hele paartijd van drie weken, de dracht en tot aan het spenen van de nakomelingen van de eerste generatie. Er dient aandacht te worden geschonken aan wijzigingen in het doseringsschema op grond van de beschikbare informatie over de teststof, zoals inductie van het teststofmetabolisme of bioaccumulatie.

De dosering bij de dieren van de eerste generatie begint nadat zij zijn gespeend en eindigt wanneer zij worden gedood.

Paring

Bij studies naar de reproduktietoxiciteit kan men hetzij één mannetje met één wijfje (1:1) of één mannetje met twee wijfjes (1:2) laten paren.

In het eerste geval moet één wijfje bij hetzelfede mannetje worden geplaatst totdat het drachtig is of er 3 weken zijn verstreken. Elke ochtend worden de wijfjes onderzocht op de aanwezigheid van sperma of vaginale plugs. Dag nul van de dracht is de dag waarop een vaginale plug of sperma wordt waargenomen. Rekening houdend met de spermatogenese dient men de nakomelingen van de eerste generatie pas te laten paren wanneer zij ten minste elf weken (muizen) of dertien weken (ratten) oud zijn. Voor de paring van de nakomelingen van de eerste generatie worden uit elk nest willekeurig een mannetje en een wijfje gekozen, die men dan kruist met een jong uit een ander nest van dezelfde dosisgroep, ten einde de tweede generatie te verkrijgen. Mannetjes en wijfjes van de eerste generatie die niet voor de paring zijn gebruikt, worden na het spenen gedood.

De paartjes waarbij de paring mislukt, dienen te worden onderzocht om de oorzaak van de kennelijke onvruchtbaarheid te bepalen. Dit kan onder meer geschieden door de dieren nogmaals te laten paren, maar dan met andere vader- of moederdieren van bewezen vruchtbaarheid, door microscopisch onderzoek van de voortplantingsorganen en door onderzoek van de oestruscycli of de spermatogenese.

Nestgrootte

De dieren waaraan gedurende het vruchtbaarheidsonderzoek de teststof wordt toegediend, krijgen de gelegenheid normaal te werpen en hun jongen tot de speentijd groot te brengen. De nestgrootte wordt hierbij niet gestandaardiseerd.

Als standaardisatie wel gebeurt, dan wordt voorgesteld als volgt tewerk te gaan. Tussen de eerste en de vierde dag na de geboorte kan de grootte van elk nest worden aangepast door het teveel aan jongen, via selectie, uit het nest te nemen om waar mogelijk 4 mannetjes en 4 wijfjes per nest over te houden. Wanneer het aantal mannelijke of vrouwelijke jongen niet toereikend is om er per nest vier van elk geslacht over te houden, kan worden volstaan met gedeeltelijke aanpassing (bij voorbeeld vijf mannetjes en drie wijfjes). Een en ander is niet van toepassing op nesten met minder dan acht jongen. Aanpassing van de nesten van de tweede generatie geschiedt op dezelfde manier.

Waarnemingen

Gedurende de hele onderzoekperiode wordt elk dier ten minste eenmaal per dag geobserveerd. Met de teststof samenhangende veranderingen in het gedrag, tekenen van een moeilijke of langdurige geboorte en alle tekenen van toxiciteit, met inbegrip van sterfte, dienen te worden vastgelegd. Gedurende de tijd die aan de paring voorafgaat en de paartijd zelf dient het verbruik van voer wekelijks te worden gemeten. Tijdens de dracht kan het verbruik van voer eventueel dagelijks worden gemeten. Na het werpen en tijdens de zoogtijd dient het verbruik van voer te worden gemeten op dezelfde dag als de nesten worden gewogen. De ouderdieren (P en F_1) dienen te worden gewogen op de eerste dag dat zij de teststof krijgen toegediend en daarna eenmaal per week. Deze waarnemingen dienen voor elk volwassen dier afzonderlijk te worden vastgelegd.

De drachttijd dient te worden berekend vanaf dag nul van de dracht. Elke worp dient zo spoedig mogelijk na de geboorte te worden onderzocht ten einde het aantal en het geslacht van de jongen vast te stellen, alsmede het aantal dood- en levendgeboren jongen en de aanwezigheid van met het blote oog zichtbare afwijkingen.

Dode jongen en jongen die op de vierde dag worden gedood, dienen te worden bewaard en op mogelijke afwijkingen te worden onderzocht. De levende jongen moeten worden geteld en de nesten moeten worden gewogen op de ochtend na de geboorte, op de vierde en de zevende dag en vervolgens wekelijks tot het eind van het onderzoek, wanneer de dieren afzonderlijk dienen te worden gewogen. Bij de moederdieren of de nakomelingen waargenomen lichamelijke of gedragsafwijkingen dienen te worden opgetekend.

Pathologie

Necropsie

Alle ouderdieren (P) en de volwassen dieren van de eerste generatie (F_1) dienen te worden gedood wanneer zij voor de bepaling van reproduktie-effecten niet langer nodig zijn. Nakomelingen van de eerste generatie die niet voor paring zijn geselecteerd, en alle nakomelingen van de tweede generatie dienen te worden gedood wanneer zij gespeend zijn.

Ale ouderdieren (P en F_1) dienen, wanneer zij worden gedood of tijdens het onderzoek sterven, microscopisch te worden onderzocht op eventuele structurele afwijkingen of pathologische veranderingen, waarbij speciaal aandacht moet worden geschonken aan de organen van het voortplantingssysteem. Dode of stervende jongen dienen op afwijkingen te worden onderzocht.

Histopathologie

Van alle voor paring geselecteerde P- en F_1-dieren moeten de eierstokken, uterus, cervix, vagina, testes, epididymides, zaadblaasjes, coagulans afscheidende klier, de prostaat, hypofyse en aangetaste organen worden bewaard voor eventueel microscopisch onderzoek. In het geval dat deze organen nog niet bij andere onderzoeken waarbij herhaalde doseringen zijn toegediend zijn onderzocht, dienen zij microscopische te worden onderzocht bij alle ouderdieren en dieren van de eerste generatie die voor paring zijn geselecteerd (zowel uit de hoogste dosisgroep als uit de controlegroep), alsmede bij de dieren die tijdens het onderzoek sterven. De organen die bij deze dieren afwijkingen vertonen, dienen bij dieren uit de andere dosisgroepen te worden onderzocht. In deze gevallen dienen alle weefsels die met het blote oog zichtbare pathologische veranderingen vertonen, microscopisch te worden onderzocht. Zoals hierboven reeds werd gesuggereerd, kunnen de voortplantingsorganen van dieren waarvan wordt vermoed dat zij onvruchtbaar zijn, aan een microscopisch onderzoek worden onderworpen.

2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het aantal drachtige dieren, de aard van de veranderingen en het percentage dieren dat elk type verandering vertoont.

Indien mogelijk, moeten de numerieke resultaten met behulp van een voor dit doel geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere algemeen erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

3. VERSLAGGEVING

3.1. **Verslag van de proefnemingen**

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

— gebruikte diersoort/stam;

— gegevens over de toxische reactie naar geslacht en dosis, met inbegrip van vruchtbaarheid, dracht en levensvatbaarheid;

— tijdstip gedurende het onderzoek waarop de dood intreedt of aangeven of dieren tot het einde van de proef in leven bleven;

— tabel met het gewicht van elke worp, het gemiddelde gewicht van de jongen en het gewicht van elk jong afzonderlijk aan het eind van het onderzoek;

— toxische of andere effecten op de reproduktie, het nageslacht, postnatale groei, enzovoort;

— dag waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en verloop hiervan;

— gegevens over het lichaamsgewicht van de ouderdieren en de dieren van de eerste generatie die voor paring zijn geselecteerd;

— bevindingen van de necropsie;

— gedetailleerde beschrijving van eventuele microscopische bevindingen;

— statistische verwerking van de resultaten, waar dat van toepassing is;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie algemene inleiding — Deel B.

4. LITERATUUR

Zie Algemene inleiding — Deel B.

TOXICOKINETIEK

1. METHODE

1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. Definities

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. Referentiestoffen

Geen.

1.4. Principe van de onderzoekmethode

De teststof wordt langs een geschikte weg toegediend. Naar gelang van het doel van het onderzoek kan de stof in één enkele dosis of in, over een bepaalde periode herhaalde, doses aan een of meer groepen proefdieren worden toegediend. Daarna worden de teststof en/of metabolieten, afhankelijk van het soort onderzoek, bepaald in lichaamsvocht, weefsel en excreta.

Het onderzoek kan worden uitgevoerd met radioactief gemerkte of niet-gemerkte vormen van de teststof. Indien radioactiviteit wordt gebruikt, moet de radioactieve isotoop zodanig in de molecule van de stof zijn ingebouwd dat een maximum aantal gegevens over het metabolisme van de verbinding wordt verkregen.

1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

Voorbereidingen

Voor het onderzoek worden gezonde, jonge, volwassen dieren gedurende ten minste vijf dagen aan de laboratoriumomstandigheden gewend. Vóór het onderzoek worden de dieren op willekeurige wijze in de te behandelen groepen ingedeeld. In speciale omstandigheden kunnen zeer jonge, drachtige of van tevoren behandelde dieren worden gebruikt.

Proefomstandigheden

Proefdieren

Toxicokinetisch onderzoek kan op een of meer geschikte diersoorten worden uitgevoerd waarbij rekening moet worden gehouden met de soorten die zijn gebruikt of zullen worden gebruikt bij ander toxicologisch onderzoek van dezelfde teststof. Indien een knaagdier wordt gebruikt voor een test mag het gewicht niet meer dan ± 20 % van het gemiddelde gewicht afwijken.

Aantal en geslacht

Voor onderzoek naar de absorptie en de uitscheiding zijn ten minste vier dieren in elke dosisgroep vereist. Er hoeft geen voorkeur te worden gegeven aan een bepaald geslacht, maar in sommige omstandigheden kan het nodig zijn beide geslachten te onderzoeken. Indien zich verschillen in reacties voordoen afhankelijk van het geslacht moeten vier dieren van elk geslacht worden getest. In het geval van onderzoek met niet-knaagdieren kan worden volstaan met een kleiner aantal dieren.

Indien de weefseldistributie wordt onderzocht, moet voor de grootte van de groep bij de aanvang van het onderzoek rekening worden gehouden met het aantal op elk tijdstip te doden dieren en het aantal te onderzoeken tijdstippen.

Indien het metabolisme wordt onderzocht, wordt de grootte van de groep bepaald door hetgeen voor het onderzoek nodig is.

Voor studies waarbij met meervoudige doseringen wordt gewerkt of waarbij op meerdere tijdstippen wordt onderzocht, dient voor de grootte van de groep rekening te worden gehouden met het aantal tijdstippen en het aantal te doden dieren, waarbij het aantal evenwel niet kleiner mag zijn dan twee. De groep moet voldoende groot zijn om de opname, het plateau en de eliminatie (als dat van toepassing is) van de teststof en/of metabolieten op aanvaardbare wijze te karakteriseren.

Dosisniveaus

Indien één enkele dosis wordt toegediend zijn ten minste twee dosisniveaus vereist. Er dient een lage dosis te worden gebruikt waarbij geen toxische effecten worden waargenomen en een hoge dosis waarbij zich toxische effecten of veranderingen in de toxicokinetische parameters voordoen.

Indien herhaalde dosering wordt toegepast, zal de lage dosis meestal volstaan, maar in bepaalde omstandigheden kan eveneens een hoge dosis noodzakelijk zijn.

Toedieningsweg

Voor toxicokinetische studies moet dezelfde toedieningsweg worden gebruikt en waar dat van toepassing is hetzelfde medium als gebruikt wordt of zal worden gebruikt voor het andere toxiciteitsonderzoek. De teststof wordt gewoonlijk oraal toegediend met behulp van een maagsonde of in het voer, aangebracht op de huid of gedurende bepaalde perioden aan groepen testdieren toegediend door inhalatie. Intraveneuze toediening kan nuttig zijn om de relatieve opname via de andere wegen te bepalen. Bovendien kan kort na de intraveneuze toediening van een stof nuttige informatie worden verkregen over het distributiepatroon.

Er dient rekening te worden gehouden met mogelijke interferenties van het medium met de teststof. Ook dient aandacht te worden gegeven aan verschillen in opname tussen de toediening van de teststof met behulp van een maagsonde en in het voer en aan de noodzaak om de dosis nauwkeurig te bepalen, met name wanneer de teststof in het voer wordt toegediend.

Observatieperiode

Alle proefdieren moeten dagelijks worden geobserveerd. Tekenen van toxiciteit en andere relevante klinische verschijnselen moeten samen met het tijdstip waarop deze voor het eerst zijn opgetreden, de mate en de duur ervan worden genoteerd.

Uitvoering

Nadat de proefdieren zijn gewogen, wordt de teststof via een geschikte weg toegediend. Indien dat belangrijk wordt geacht, kunnen de dieren voor het toedienen van de teststof worden gevast.

Absorptie

De opnamesnelheid en de opgenomen hoeveelheid van de toegediende stof kunnen aan de hand van verschillende methoden worden beoordeeld, met en zonder referentiegroep (1), bij voorbeeld:

— bepaling van de hoeveelheid teststof en/of metabolieten in excreta, zoals urine, gal, uitwerpselen, uitgeademde lucht en in het karkas resterende stof;

— vergelijking van de biologische reactie (bij voorbeeld acute toxiciteitsstudies) tussen de proefgroep en controle- en/of referentiegroepen;

— vergelijking van de hoeveelheid via de nieren uitgescheiden stof en/of metabolieten in testgroep en referentiegroepen;

— bepaling van de oppervlakte onder de plasmaconcentratie/tijdcurve van de teststof en/of metabolieten en vergelijking met gegevens van een referentiegroep.

(1) In deze methode is een referentiegroep een groep waarbij de teststof via een andere weg wordt toegediend waarbij zeker is dat de dosis volledig wordt geresorbeerd.

Distributie

Momenteel zijn twee methoden beschikbaar. Een ervan of beide kunnen worden gebruikt voor de analyse van distributiepatronen:

— met behulp van autoradiografie van het hele lichaam worden nuttige kwalitatieve gegevens verkregen,

— het doden van dieren op verschillende tijdstippen na de blootstelling en het bepalen van de concentratie en de hoeveelheid teststof en/of metabolieten in weefsels en organen leveren kwantitatieve gegevens.

Uitscheiding

Bij uitscheidingsstudies worden urine, uitwerpselen en uitgeademde lucht en, in bepaalde gevallen, gal verzameld. De hoeveelheid teststof en/of metabolieten in deze excreta dient op diverse tijdstippen na blootstelling te worden gemeten totdat circa 95 % van de toegediende dosis is uitgescheiden of gedurende zeven dagen, wat zich het eerst voordoet.

In speciale gevallen kan het nodig zijn rekening te houden met de uitscheiding van de teststof in de melk van zogende proefdieren.

Metabolisme

Ten einde de omvang en het patroon van het metabolisme van de teststof te bepalen, dienen de biologische monsters met behulp van geschikte technieken te worden geanalyseerd. Indien vragen uit voorafgaand toxicologisch onderzoek moeten worden opgelost, dient de moleculaire structuur van de metabolieten te worden gekarakteriseerd en moeten geschikte metabolismewegen worden voorgesteld. Het kan nuttig zijn onderzoek in vitro te verrichten om gegevens te verkrijgen over het metabolismepatroon.

Nadere gegevens over het verband tussen metabolisme en toxiciteit kunnen worden verkregen door biochemische studies, zoals het bepalen van effecten op de enzymesystemen die het metabolisme veroorzaken, uitputting van endogene niet-eiwit sulfhydrylverbindingen en de binding van de stof aan macromoleculen.

2. GEGEVENS

Naargelang van het soort onderzoek dienen de gegevens in tabellen te worden samengevat en zoveel mogelijk te worden ondersteund met grafische voorstellingen. Voor elke testgroep dienen, wanneer dat van toepassing is, de gemiddelde en statistische variatie van metingen met betrekking tot tijd, dosering, weefsels en organen te worden vermeld. De mate van absorptie, de hoeveelheid en de snelheid van uitscheiding moeten met geschikte methoden worden bepaald. Wanneer onderzoek naar het metabolisme wordt verricht, dient de moleculaire structuur van de geïdentificeerde metabolieten te worden opgegeven en moeten eventuele metabolismewegen worden voorgesteld.

3. VERSLAGGEVING

3.1. Verslag van de proefneming

Naar gelang van het soort onderzoek moeten, indien mogelijk, in het verslag de volgende gegevens worden opgenomen:

— diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voer, enzovoort;

— kenmerken van de eventueel gebruikte gemerkte materialen;

— gebruikte dosisniveaus en intervallen;

— toedieningsweg(en) en eventueel gebruikt medium;

— waargenomen toxische en andere effecten;

— methoden voor het opsporen van de teststof en/of metabolieten in biologische monsters, met inbegrip van de uitgeademde lucht;

— rangschikking van metingen in tabelvorm naar geslacht, dosis, regime, tijdstip, weefsels en organen;

— gegevens over de mate van opname en uitscheiding in de tijd;

— methoden voor de omschrijving en opsporing van metabolieten in biologische monsters;

— methoden voor biologische metingen met betrekking tot het metabolisme;

— voorgestelde wegen voor metabolisme;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. **LITERATUUR**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

MUTAGENITEITSONDERZOEK EN SCREENING OP CARCINOGENESE

GENMUTATIE — SACCHAROMYCES CEREVISIAE

1. METHODE

1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. Definitie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. Referentiestoffen

Geen.

1.4. Principe van de onderzoekmethode

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

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

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

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

1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

Voorbereidingen

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

Metabole activering

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

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

Proefomstandigheden

Proefstammen

De haploïde stam XV 185-14 C en de diploïde stam D_7 zijn het meest gebruikt voor onderzoek naar genmutaties. Andere stammen kunnen eveneens geschikt zijn.

Media

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

Gebruik van negatieve en positieve controles

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

Blootstellingsconcentraties

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

Incubatieomstandigheden

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

Spontane mutatiefrequenties

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

Aantal replica's

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

Uitvoering

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

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

2. GEGEVENS

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

3. VERSLAGGEVING

3.1. Verslag van de proefneming

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

— gebruikte stam;

— proefomstandigheden: stationaire fase of groeiende cellen; samenstelling van de media; incubatietemperatuur en -duur; metabool activeringssysteem;

— behandelingsomstandigheden: blootstellingsniveaus; procedure en duur van de behandeling; behandelingstemperatuur; positieve en negatieve controles;

— aantal getelde kolonies; aantal mutanten; overlevings- en mutatiefrequentie; dosis-responsverhouding (waar dat van toepassing is); statistische beoordeling van gegevens;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. Evaluatie en interpretatie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. LITERATUUR

Zie Algemene inleiding — Deel B.

MITOTISCHE RECOMBINATIE — SACCHAROMYCES CEREVISIAE

1. METHODE

1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. Definitie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. Referentiestoffen

Geen.

1.4. Principe van de onderzoekmethode

Mitotische recombinatie bij Saccharomyces cerevisiae kan worden vastgesteld tussen genen (of meer algemeen tussen een gen en zijn centromeer) en binnen genen. Het eerste verschijnsel wordt mitotische overkruising genoemd en genereert reciproke produkten terwijl het laatste verschijnsel meestal niet reciprook is en genconversie wordt genoemd. Overkruising kan over het algemeen worden vastgesteld door de produktie van recessieve homozygote kolonies of sectoren in een heterozygote stam terwijl genconversie wordt vastgesteld door de produktie van prototrofe revertanten in een auxotrofe heteroallele stam die twee verschillende defecte allelen van hetzelfde gen draagt. De voor het opsporen van mitotische genconversie meest gebruikte stammen zijn D_4 (heteroalleel in ade2 en trp5), D_7 (heteroalleel in trp5), BZ_{34} (heteroalleel in arg4) en JD1 (heteroalleel in his4 en trp5). Mitotische overkruising waarbij rode en roze homozygote sectoren worden geproduceerd, kan worden vastgesteld in D_5 of D_7 (waarin ook de mitotische genconversie en de terugwaartse mutatie in ilv 1-92 worden gemeten), aangezien beide stammen heteroalleel zijn voor complementerende allelen van ade2.

1.5. Kwaliteitscriteria

Geen

1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

Voorbereidingen

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

Metabole activering

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

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

Proefomstandigheden

Proefstammen

De meest gebruikte stammen zijn de diploïden D_4, D_5, D_7 en JD1. Andere stammen kunnen ook gebruikt worden.

Media

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

Gebruik van negatieve en positieve controles

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

Blootstellingsconcentraties

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

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

Incubatieomstandigheden

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

Spontane mitotische recombinatiefrequentie

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

Aantal replica's

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

Uitvoering

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

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

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

2. GEGEVENS

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

Alle resultaten worden in een onafhankelijke proef bevestigd.

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

3. VERSLAGGEVING

3.1. **Verslag van de proefneming**

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

— gebruikte stam;

— proefomstandigheden: stationaire fase of groeiende cellen; samenstelling van de media; incubatietemperatuur en -duur; metabool activeringssysteem;

— behandelingsomstandigheden: blootstellingsconcentratie; procedure en duur van de behandeling; behandelingstemperatuur; positieve en negatieve controles;

— aantal getelde kolonies; aantal recombinanten; overleving en recombinatie-frequentie; dosis — responsverhouding (waar dat van toepassing is); statistische evaluatie van de gegevens;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. LITERATUUR

Zie Algemene inleiding — Deel B.

GENMUTATIETEST — ZOOGDIERENCELLEN IN VITRO

1. METHODE

1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. Definitie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. Referentiestoffen

Geen.

1.4. Principe van de onderzoekmethode

Cultuursystemen van zoogdiercellen kunnen worden gebruikt om door chemische stoffen geïnduceerde mutaties op te sporen. Veel gebruikte cellijnen zijn onder meer L5178Y lymfomacellen van de muis en de CHO en V-79 cellijnen van de Chinese hamster. Bij deze cellijnen meten de meest gebruikte systemen mutaties op de thymidine kinase (TK), hypoxanthine guanine fosforibosyl transferase (HPRT) (1) en Na^+/K^+ ATPase loci. De TK en HPRT mutatiesystemen sporen basepaarmutaties, „frame shift"-mutaties en kleine deleties op; het Na^+/K^+ systeem detecteert uitsluitend basepaarmutaties.

Cellen met thymidine kinase deficiëntie (TK) ten gevolge van de voorwaartse mutatie $TK^+ - Tk^-$ zijn resistent voor broomdeoxyuridine (BrdU), fluordeoxyuridine (FdU) of trifluorthymidine (TFT), omdat deze antimetabolieten niet in het celnucleotide worden opgenomen door het „reddings"-thymidine-kinase-enzymsysteem; de voor cellulair metabolisme vereiste nucleotiden kunnen uitsluitend door de-novo-synthese worden verkregen. In aanwezigheid van thymidine kinase worden BrdU, FdU of TFT evenwel in de nucleotiden opgenomen, waardoor cellulair metabolisme en cytotoxiciteit worden geremd. De mutantcellen kunnen dus in aanwezigheid van BrdU, FdU of TFT profiereren, terwijl de normale cellen die thymidine kinase bevatten zulks niet kunnen. Op dezelfde manier kunnen cellen met HPRT deficiëntie worden geselecteerd op grond van de resistentie voor 8-azaguanine (AG) of 6-thioguanine (TG). Cellen met een gewijzigde Na^+/K^+ ATPase worden geselecteerd door resistentie voor ouabaïne.

De cytotoxiciteit wordt bepaald door meting van het effect van de teststof op de kolonievorming (cloningsefficiëntie) of de groeisnelheid van de culturen. De mutantfrequentie wordt bepaald door bekende aantallen cellen uit te zaaien in medium dat het selectief agens bevat om mutantcellen op te sporen en in medium zonder selectief agens om de overlevende cellen op te sporen. Na een toepasselijke incubatieperiode worden de kolonies geteld. De mutantfrequenties worden berekend uit het aantal mutantkolonies na correctie voor celoverleving.

1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

Voorbereidingen

Cellen

Voor deze toets staat een verscheidenheid aan cellijnen ter beschikking. Dit zijn onder meer subclonen van L5178Y, CHO-cellen of V-79 cellen met een bewezen gevoeligheid voor chemische mutagenen, een hoge cloningsefficiëntie en een lage spontane mutatiefrequentie. De cellen dienen op gezette tijden te worden gecontroleerd op stabiliteit van het karyotype en moeten worden gecontroleerd op mycoplasma-contaminatie. Ook andere celtypes kunnen worden gebruikt, op voorwaarde dat de validiteit ervan als toets voor chemisch geïnduceerde genmutaties volledig kan worden gedocumenteerd.

(1) Vroeger HGPRT.

Medium

Er worden geschikte cultuurmedia en incubatieomstandigheden (temperatuur, gebruikte kweekflessen, CO_2-gehalte en vochtigheid) gebruikt. Media en sera moeten overeenkomstig de in de toets gebruikte selectieve systemen en celtypes worden gekozen.

Teststof

De teststoffen worden voor de behandeling van de cellen hetzij in cultuurmedia bereid hetzij opgelost of gesuspendeerd in geschikte middelen. De uiteindelijke concentratie van het medium in het cultuursysteem mag de levensvatbaarheid van de cellen of de groeisnelheid niet beïnvloeden.

Metabole activering

De cellen moeten met en zonder exogeen metabool activeringssysteem aan de teststoffen worden blootgesteld. Indien evenwel celtypes met een intrinsieke metabole activiteit worden gebruikt, moet vooraf worden onderzocht of aard en omvang van de activiteit geschikt is voor de te onderzoeken chemische klasse.

Proefomstandigheden

Gebruik van positieve en negatieve controles

Voor elke proefneming moet een positieve controle worden uitgevoerd, waarbij zowel een rechtstreeks werkende stof als een stof die metabole activering vereist worden gebruikt: er dient eveneens een negatieve (medium) controle te worden gebruikt:

De volgende stoffen zijn voorbeelden van stoffen die als positieve controle kunnen worden gebruikt:

— direct werkende stoffen:
  — ethylmethaansulfonaat,
  — hycanthone;
— indirect werkende stoffen:
  — 2-acetylaminofluoreen,
  — 7,12-dimethylbenzanthraceen,
  — N-nitrosodimethylamine.

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

Blootstellingsconcentraties

Er zijn meerdere concentraties van de teststof vereist. Deze concentraties moeten een concentratiegebonden toxisch effect veroorzaken waarbij de hoogste concentratie een laag niveau van overlevingspeil geeft en de overleving in de laagste concentratie nagenoeg dezelfde is als die in de negatieve controle.

In water relatief onoplosbare stoffen dienen met behulp van geschikte methoden tot de uiterste oplosbaarheidsgrens te worden onderzocht. Voor volledig in water oplosbare, niet-toxische stoffen dient de hoogste concentratie per geval te worden bepaald.

Uitvoering

Het aantal per cultuur gebruikte cellen dient afhankelijk te zijn van de spontane mutatiefrequentie; een algemene vuistregel is een aantal leefbare cellen te gebruiken dat tienmaal het reciproke is van de spontane mutatiefrequentie.

De cellen moeten gedurende een geschikte tijd worden blootgesteld; in de meeste gevallen volstaan twee tot vijf uur. Cellen met een ontoereikende intrinsieke metabole activiteit moeten met en zonder een geschikt metabool activeringssysteem aan de teststof worden blootgesteld. Na de blootstellingsperiode wordt de teststof van de cellen gewassen en worden de cellen gekweekt ter bepaling van de levensvatbaarheid en om expressie van het fenotype van de mutant te verkrijgen.

Na de expressieperiode welke voldoende lang moet zijn voor een nagenoeg optimale fenotypische expressie van geïnduceerde mutanten worden de cellen gekweekt in een medium met en zonder selectieve agentia ter bepaling van het aantal mutanten en van de levensvatbaarheid.

Alle resultaten worden in een onafhankelijke proef bevestigd.

2. GEGEVENS

De gegevens moeten in tabellen worden samengevat. De resultaten per afzonderlijke plaat voor de teststof en de controle moeten worden vermeld voor mutatie-inductie en overleving. Het gemiddelde aantal kolonies per plaat en de standaardafwijking moet eveneens worden opgegeven. De mutatiefrequentie wordt uitgedrukt als aantal mutanten per aantal overlevende cellen. Overleving en cloningsefficiëntie worden uitgedrukt in percenten van het controleniveau.

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

3. VERSLAGGEVING

3.1. **Verslag van de proefneming**

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

— gebruikte cellijn, aantal celculturen, methode voor het in stand houden van celculturen;

— proefomstandigheden: samenstelling van de media, CO_2-gehalte, concentratie van de teststof, gebruikt (oplos)middel, incubatietemperatuur, incubatietijd, duur van de expressieperide (inclusief aantal uitgezaaide cellen en subculturen en voedingsschema), duur van de behandeling, celdichtheid tijdens de behandeling, gebruikt type metabool activeringssysteem verkregen uit zoogdieren, positieve en negatieve controles, gebruikte selectieve agentia;

— verantwoording voor de keuze van de dosis;

— gebruikte methode voor het tellen van het aantal levensvatbare en mutantcellen;

— statistische evaluatie;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. LITERATUUR

Zie Algemene inleiding — Deel B.

DNA-BESCHADIGING EN HERSTEL — DNA-HERSTELSYNTHESE — ZOOGDIERENCELLEN IN VITRO

1. METHODE

1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. Definitie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. Referentiestoffen

Geen.

1.4. Principe van de onderzoekmethode

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

1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

Voorbereidingen

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

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

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

Proefomstandigheden

Aantal culturen

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

Gebruik van negatieve en positieve controles

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

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

Blootstellingsconcentratie

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

Cellen

Om de culturen in stand te houden moeten geschikte groeimedia, CO_2-concentraties, temperatuur en vochtigheidsgraad worden gebruikt. Permanente cellijnen moeten regelmatig worden gecontroleerd op Mycoplasma-contaminatie.

Metabole activering

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

Uitvoering

Bereiding van culturen

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

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

Menselijke lymfocytculturen worden met behulp van geschikte technieken gemaakt.

Behandeling van de culturen met de teststof

Primaire rattenhepatocyten

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

Permanente cellijnen en lymfocyten

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

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

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

Analyse

Autoradiografische analyse

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

LSC-analyse

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

Alle resultaten moeten in een onafhankelijke proef worden bevestigd.

2. GEGEVENS

De gegevens moeten in tabellen worden samengevat.

2.1. Autoradiografische analyse

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

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

2.2. LSC-analyse

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

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

3. VERSLAGGEVING

3.1. Verslag van de proefneming

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

— gebruikte cellen, dichtheid en passagegetal op het ogenblik van de behandeling, aantal celculturen;

— toegepaste methode voor instandhouding van de celculturen met inbegrip van medium, temperatuur en CO_2-concentratie;

— teststof, medium, concentraties en verantwoording voor de in de test gebruikte concentraties;

— gegevens over het metabole activeringssysteem;

— behandelingsschema;

— positieve en negatieve controles;

— toegepaste autoradiografische techniek;

— toegepaste methode om te voorkomen dat de cellen in de S-fase treden;

— toegepaste methode voor DNA-extractie en bepaling van het totale DNA-gehalte in LSC-analyses;

— indien mogelijk de dosis-responsverhouding;

— statistische evaluatie;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. **LITERATUUR**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

ZUSTERCHROMATIDEN-UITWISSELINGSTEST IN VITRO

1. METHODE

1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. Definitie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. Referentiestoffen

Geen.

1.4. Principe van de onderzoekmethode

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

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

1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

Voorbereidingen

— Voor de test kunnen primaire culturen (menselijke lymfocyten) of gevestigde cellijnen (bij voorbeeld ovariumcellen van de Chinese hamster) worden gebruikt. De cellijnen moeten worden gecontroleerd op Mycoplasma-contaminatie.

— Er moeten geschikte cultuurmedia en incubatieomstandigheden worden gebruikt (bij voorbeeld temperatuur, cultuurflessen, CO_2-gehalte en vochtigheidsgraad).

— Vóór de behandeling van de cellen dienen de teststoffen te worden klaargemaakt in cultuurmedia of opgelost of gesuspendeerd in geschikte middelen. De uiteindelijke concentratie van een medium in het cultuursysteem mag geen significante invloed hebben op de levensvatbaarheid of de groeisnelheid van de cel en effecten op de SCE-frequentie moeten door middel van een oplosmiddelcontrole worden nagegaan.

— De cellen moeten met en zonder exogeen metabool activeringssysteem bereid uit zoogdieren aan de teststoffen worden blootgesteld. Indien evenwel cellen met intrinsieke metabole activiteit worden gebruikt, moeten de aard en de omvang van de activiteit geschikt zijn voor de te onderzoeken chemische klasse.

Proefomstandigheden

Aantal culturen

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

Gebruik van positieve en negatieve controles

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

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

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

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

Blootstellingsconcentratie

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

Uitvoering

Bereiding van culturen

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

Behandeling

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

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

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

Winning van de cellen

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

Chromosoompreparatie en kleuring

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

Analyse

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

2. GEGEVENS

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

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

3. VERSLAGGEVING

3.1. Verslag van de proefneming

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

— gebruikte cellen, methoden voor het in stand houden van de celculturen;

— proefomstandigheden: samenstelling van cultuurmedia, CO_2-concentratie, concentratie van de teststof, gebruikt oplosmiddel, incubatietemperatuur, behandelingstijd, toegepaste „spindle"-remmer, de concentratie ervan en de duur van de behandeling, gebruikte soort metabool activeringssysteem bereid uit zoogdieren, positieve en negatieve controles;

— aantal celculturen per punt in de proef;

— nadere gegevens omtrent de toegepaste techniek voor het prepareren van glaasjes;

— aantal geanalyseerde metafasen (de gegevens dienen voor elke cultuur afzonderlijk te worden vermeld);

— gemiddeld aantal SCE's per metafase en per chromosoom (de gegevens dienen voor elke cultuur afzonderlijk te worden vermeld);

— criteria voor het tellen van SCE's;

— verantwoording voor de gekozen dosis;

— dosis-responsverhouding (indien mogelijk);

— statistische evaluatie;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. Evaluatie en interpretatie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. LITERATUUR

Zie Algemene inleiding — Deel B.

GESLACHTSGEBONDEN RECESSIEVE LETALITEITSTEST MET DROSOPHILA MELANOGASTER

1. METHODE

1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. Definitie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. Referentiestoffen

Geen.

1.4. Principe van de onderzoekmethode

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

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

1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

Voorbereidingen

Stamculturen

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

Teststof

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

Aantal dieren

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

Toedieningsweg

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

Gebruik van negatieve en positieve controles

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

Blootstellingsniveau

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

Uitvoering

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

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

2. GEGEVENS

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

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

3. VERSLAGGEVING

3.1. Verslag van de proefneming

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

— stamcultuur: gebruikte Drosophilastammen, leeftijd van de insekten, aantal behandelde mannetjes, aantal steriele mannetjes, aantal gevormde F_2-culturen, aantal F_2-culturen zonder nakomelingen, aantal in elke geslachtscelfase aangetroffen chromosomen met een letaal kenmerk;

— criteria voor de bepaling van de omvang van de behandelde groepen;

— proefomstandigheden: gedetailleerde beschrijving van het behandelings- en bemonsteringsschema, blootstellingsniveaus, toxiciteitsgegevens, negatieve (oplosmiddel) en positieve controles (waar dat van toepassing is);

— criteria voor het tellen van letale mutaties;

— blootstelling/effectverhouding (indien mogelijk);

— statistische evaluatie;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. Evaluatie en interpretatie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. LITERATUUR

Zie Algemene inleiding — Deel B.

ZOOGDIERENCELTRANSFORMATIETEST IN VITRO

1. METHODE

1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. Definitie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. Referentiestoffen

Geen.

1.4. Principe van de onderzoekmethode

Cultuursystemen van zoogdierencellen kunnen worden gebruikt voor het onderzoek van fenotypische veranderingen in vitro die worden geïnduceerd door chemische stoffen die betrokken zijn bij maligne transformaties in vivo. Algemeen gebruikte cellen zijn onder meer C3H10T½, 3T3, SHE, en Fisher-rat. De test is gebaseerd op wijzigingen in de celmorfologie, focusvorming of wijzigingen in de afhankelijkheid van de aanhechting in halfvast agar. Er bestaan andere, minder gebruikte systemen die andere fysiologische of morfologische wijzigingen in cellen ten gevolge van blootstelling aan carcinogene chemische stoffen opsporen. Van geen van de eindpunten van de in-vitro-proef staat vast dat er een mechanistische band is met kanker. Met enkele testsystemen kunnen tumorpromotoren worden opgespoord. Cytotoxiciteit kan worden bepaald door meting van het effect van de teststof op de kolonievorming (cloningsefficiëntie) of de groeisnelheid van de culturen. De cytotoxiciteitsbepaling kan worden gebruikt om vast te stellen dat blootstelling aan de teststof een toxisch effect heeft gehad, maar kan niet in alle testen worden gebruikt om de transformatiefrequentie te berekenen, aangezien voor sommige testen een langere incubatie en/of opnieuw uitplaten noodzakelijk kunnen zijn.

1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

Voorbereidingen

Cellen

Een verscheidenheid aan cellijnen of primaire cellen is beschikbaar afhankelijk van de toegepaste transformatietest. De onderzoeker moet nagaan of de cellen voor de uit te voeren proef na blootstelling aan bekende carcinogenen de juiste fenotypische wijzigingen vertonen en dient ervoor te zorgen dat de validiteit en betrouwbaarheid van de in zijn laboratorium uitgevoerde test aangetoond en gedocumenteerd wordt.

Medium

De gebruikte media en proefomstandigheden dienen geschikt te zijn voor de uit te voeren transformatietesten.

Teststof

De teststof mag in cultuurmedia worden bereid of voor de behandeling van de cellen worden opgelost of gesuspendeerd in geschikte middelen. De uiteindelijke concentratie van het (oplos)middel in het cultuursysteem mag de levensvatbaarheid van de cellen, de groeisnelheid of de mate van voorkomen van transformaties niet beïnvloeden.

Metabole activering

De cellen dienen met en zonder geschikt metabool activeringssysteem aan de teststof te worden blootgesteld. Indien evenwel celsoorten worden gebruikt met een intrinsieke metabole activiteit, moet worden nagegaan of de aard van de activiteit geschikt is voor de onderzochte chemische klasse.

Proefomstandigheden

Gebruik van positieve en negatieve controles

Voor elke proef moet een positieve controle worden uitgevoerd waarbij zowel een rechtstreeks werkende verbinding als een verbinding die metabole activering vereist, moeten worden meegenomen: er dient eveneens een negatieve (oplos)middelcontrole te worden gebruikt.

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

— Direct werkende stoffen:
  — ethylmethaansulfonaat,
  — β-propiolacton;
— Verbindingen die metabole activering vereisen:
  — 2-acetylaminofluoreen,
  — 4-dimethylaminoazobenzeen,
  — 7,12-dimethylbenzanthraceen.

Wanneer dat van toepassing is, dient een aanvullende positieve controle van dezelfde chemische klasse als de teststof te worden uitgevoerd.

Blootstellingsconcentraties

Meerdere concentraties van de teststof moeten worden gebruikt. Deze concentraties moeten een concentratieafhankelijk toxisch effect veroorzaken waarbij de hoogste concentratie een laag overlevingspeil geeft en de overleving in de laagste concentratie nagenoeg dezelfde is als die in de negatieve controle. In water relatief onoplosbare stoffen dienen met behulp van geschikte methoden tot de uiterste oplosbaarheidsgrens te worden onderzocht. Voor volledig in water oplosbare, niet-toxische stoffen dient de hoogste concentratie per geval te worden bepaald.

Uitvoering

De cellen moeten voldoende lang worden blootgesteld. De tijd is afhankelijk van het toegepaste testsysteem en bij langere blootstellingstijden kan het noodzakelijk zijn een nieuwe dosis toe te dienen en gelijktijdig het medium te veranderen (met indien noodzakelijk een vers metabool activeringsmengsel). Cellen met een ontoereikende intrinsieke metabole activiteit moeten met en zonder een geschikt metabool activeringssysteem aan de teststof worden blootgesteld. Na de blootstellingsperiode wordt de teststof van de cellen gewassen en worden de cellen op cultuurmedia gebracht onder omstandigheden die gunstig zijn om het verschijnen van getransformeerde fenotypes te controleren en wordt de mate van voorkomen van de transformaties bepaald. Alle resultaten worden in een onafhankelijke proef bevestigd.

2. GEGEVENS

De gegevens moeten in tabellen worden samengevat en kunnen naar gelang van de gebruikte toets in diverse vormen worden voorgesteld, bij voorbeeld plaattellingen, positieve platen of aantal getransformeerde cellen. Wanneer dat van toepassing is, dient de overleving te worden uitgedrukt als een percentage van het controleniveau en de transformatiefrequentie als het aantal transformaties per aantal overlevenden. De gegevens moeten met behulp van een geschikte statistische methode worden geëvalueerd.

3. VERSLAGGEVING

3.1. Verslag van de proefneming

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

— gebruikt celtype, aantal celculturen, methode voor het in stand houden van celculturen;

— proefomstandigheden: concentratie van de teststof, gebruikt (oplos)middel, incubatietemperatuur, incubatietijd, duur en frequentie van de behandeling, celdichtheid tijdens de behandeling, type van het gebruikte exogeen metabool activeringssysteem, positieve en negatieve controles, specificatie van het onderzochte fenotype, gebruikt selectief systeem (wanneer dat van toepassing is); verantwoording voor de keuze van de doses;

— gebruikte methode voor het tellen van het aantal levensvatbare en getransformeerde cellen;

— statistische evaluatie;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. **LITERATUUR**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

ONDERZOEK NAAR DOMINANTE LETALE MUTATIES BIJ KNAAGDIEREN

1. METHODE

1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. Definities

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. Referentiestoffen

Geen.

1.4. Principe van de onderzoekmethode

Dominante letale effecten veroorzaken de dood van het embryo of van de foetus. De inductie van dominante letale mutaties door blootstelling aan een chemische stof wijst erop dat de stof het geslachtsweefsel van de proefdiersoort heeft aangetast. Algemeen wordt aangenomen dat dominante letale mutaties het gevolg zijn van beschadiging van de chromosomen (structurele en numerieke anomalieën). Als vrouwtjes worden behandeld, kan de dood van het embryo eveneens het gevolg zijn van toxische effecten.

In het algemeen worden mannetjes aan de teststof blootgesteld en met niet-behandelde, niet-gedekte vrouwtjes gepaard. De diverse geslachtscelstadia kunnen door middel van geregelde intervallen in de paring afzonderlijk worden onderzocht. De toename van het aantal dode implantaten per vrouwtje in de behandelde groep in vergelijking met het aantal dode implantaten per vrouwtje in de controlegroep geeft het verlies na implantatie weer. Het verlies voor implantatie kan worden geschat op grond van tellingen van de corpora lutea of door het totale aantal implantaten per vrouwtje in de behandelde en de controlegroep met elkaar te vergelijken. Het totale dominante letale effect is de som van het verlies voor en na de implantatie. De berekening van het totale dominante letale effect is gebaseerd op de vergelijking van de levende implantaten per vrouwtje in de testgroep met de levende implantaten per vrouwtje in de controlegroep. Een vermindering van het aantal implantaten op bepaalde tijdstippen kan het gevolg zijn van het doodgaan van cellen (bij voorbeeld van spermatocyten en/of spermatogonia).

1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

Voorbereidingen

Zo mogelijk moeten de teststoffen in een isotone zoutoplossing worden opgelost of gesuspendeerd. Niet in water oplosbare chemische stoffen kunnen in geschikte (oplos)middelen worden opgelost of gesuspendeerd. Het gebruikte (oplos)middel mag niet met de teststof interfereren en mag ook geen toxische effecten produceren. Er dienen verse bereidingen van de teststof te worden gebruikt.

Proefomstandigheden

Toedieningsweg

De teststof moet in het algemeen slechts eenmaal worden toegediend. Op grond van toxicologische gegevens kan een schema met herhaalde behandelingen worden gebruikt. De normale toedieningswegen zijn orale intubatie of intraperitoneale injectie. Andere toedieningswegen kunnen eveneens geschikt zijn.

Proefdieren

Ratten of muizen worden als proefdieren aanbevolen. Gezonde, geslachtelijk volledig rijpe dieren worden willekeurig ingedeeld in te behandelen groepen en controlegroepen.

Aantal en geslacht

Er dient een passend aantal behandelde mannetjes te worden gebruikt, rekening houdend met de spontane variatie van het te onderzoeken biologische kenmerk. Het gekozen aantal moet gebaseerd zijn op de van tevoren vastgestelde detectiegevoeligheid en significantie. Zo moet bij voorbeeld bij een kenmerkende test het aantal mannetjes in elke dosisgroep voldoende zijn om per paringsinterval 30 à 50 drachtige vrouwtjes te hebben.

Negatieve en positieve controles

In het algemeen moet elk experiment parallelle positieve en negatieve (oplos)middelcontroles omvatten. Indien aanvaardbare positieve controleresultaten uit het recente verleden van in hetzelfde laboratorium verrichte experimenten beschikbaar zijn, kunnen deze worden gebruikt in plaats van een parallelle positieve controle. Positieve controlestoffen moeten in een voldoende lage dosis (bij voorbeeld MMS, i.p., bij 10 mg/kg) worden gebruikt om de gevoeligheid van de test aan te tonen.

Dosisniveaus

Normaliter moeten drie dosisniveaus worden gebruikt. De hoge dosis moet bij de behandelde dieren tekenen van toxiciteit of verminderde vruchtbaarheid teweegbrengen. In sommige gevallen kan met één enkele hoge dosis worden volstaan.

Hoogste te testen dosis

Niet-toxische stoffen moeten in doses van 5 g/kg bij één enkele toediening of in doses van 1 g/kg/dag bij herhaalde toediening worden getest.

Uitvoering

Er zijn diverse behandelingsschema's beschikbaar. Enkelvoudige toediening van de teststof is de meest toegepaste methode. Er kunnen ook andere behandelingsschema's worden gebruikt.

Na de behandeling laat men individuele mannetjes opeenvolgend na geschikte intervallen, met een of twee niet-behandelde, nog niet-gedekte vrouwtjes paren. De vrouwtjes moeten bij de mannetjes worden gelaten gedurende ten minste één volledige oestruscyclus of tot op het ogenblik dat de paring heeft plaatsgevonden, hetgeen wordt bepaald door de aanwezigheid van sperma in de vagina of door de aanwezigheid van een vaginale plug.

Het aantal paringen na de behandeling is afhankelijk van het behandelingsschema en moet groot genoeg zijn om alle geslachtscelstadia na de behandeling te kunnen onderzoeken.

De vrouwtjes worden in de tweede helft van de dracht gedood en de inhoud van de uterus wordt onderzocht om het aantal dode en levende implantaties te bepalen. Ook de eierstokken kunnen worden onderzocht om het aantal corpora lutea te bepalen.

2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten in tabellen worden weergegeven: aantal mannetjes, aantal drachtige vrouwtjes en aantal niet-drachtige vrouwtjes. De resultaten van elke paring, met inbegrip van de identiteit van elk mannetje en elk vrouwtje, moeten afzonderlijk worden gerapporteerd. Voor elk vrouwtje moet de week van de paring, het dosisniveau van het mannetje en de frequentie van levende en dode implantaten worden aangegeven.

De berekening van het totale dominante letale effect is gebaseerd op de vergelijking van de levende implantaten per vrouwtje in de testgroep met de levende implantaten per vrouwtje in de controlegroep. De verhouding tussen dode en levende implantaten bij de behandelde groep, vergeleken met dezelfde verhouding bij de controlegroep, wordt geanalyseerd om het verlies na implantatie na te gaan.

Als de gegevens van vroegtijdige en laattijdige sterften worden geregistreerd, moet dat uit de tabellen duidelijk blijken. Als het verlies vóór implantatie wordt geschat, moet dat worden gerapporteerd. Het verlies vóór implantatie kan worden berekend als een discrepantie tussen het aantal corpora lutea en het aantal implantaten of als een daling van het gemiddelde aantal implantaten per uterus in vergelijking met controleparingen.

De gegevens worden met behulp van geschikte statistische methoden geëvalueerd.

3. VERSLAGGEVING

3.1. **Verslag van de proefnemingen**

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

— diersoort, stam, leeftijd en gewicht van de gebruikte dieren, aantal dieren van elk geslacht in de experimentele en controlegroepen;

— teststof, (oplos)middel; geteste dosisniveaus en verantwoording voor de selectie van de dosering, negatieve en positieve controles, gegevens over de toxiciteit;

— expositiewijze en -duur;

— paringsschema;

— gebruikte methode om te bepalen dat de paring heeft plaatsgevonden;

— tijdstip waarop de dieren worden gedood;

— criteria voor de beoordeling van dominante letale mutaties;

— dosis/responsverhouding (waar dat van toepassing is);

— statistische evaluatie;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. LITERATUUR

Zie Algemene inleiding — Deel B.

CYTOGENETICA VAN GESLACHTSCELLEN BIJ ZOOGDIEREN

1. METHODE

1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. Definitie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. Referentiestoffen

Geen.

1.4. Principe van de onderzoekmethode

Deze cytogenetische test in vivo detecteert structurele chromosoomaberraties in spermatogonia. Spermatogoniale mitoses worden op chromatide- en chromosoomaberraties onderzocht.

Bij het onderzoek wordt gebruik gemaakt van testespreparaten van mannelijke zoogdieren die via geschikte toedieningswegen aan de teststoffen zijn blootgesteld en op verschillende tijden zijn gedood. Voordat zij worden gedood, worden de dieren verder behandeld met „spindle"-remmers zoals colchicine om cellen in een metafaseachtig stadium van de mitose (c-metafase) te accumuleren. Aan de lucht gedroogde chromosoompreparaten worden gemaakt, gekleurd en microscopisch onderzocht.

De analyse van spermatocyten in diakinesemetafase I op multivalente translocaties na behandeling van spermatogoniale stamcellen kan nuttige aanvullende gegevens opleveren.

1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

Voorbereidingen

De teststoffen worden in een isotonische zoutoplossing opgelost. Als deze onoplosbaar zijn, worden zij in een geschikt (oplos)middel opgelost of gesuspendeerd. Er worden vers bereide oplossingen van de teststof gebruikt. Als een (oplos)middel wordt gebruikt om de dosering te vergemakkelijken, mag dit niet interfereren met de teststof en geen toxische effecten veroorzaken.

Toedieningsweg

De teststoffen moeten in het algemeen slechts eenmaal worden toegediend. Op grond van toxicologische informatie kan een schema met herhaalde behandelingen worden gebruikt. De herhaalde behandeling kan evenwel alleen worden toegepast op voorwaarde dat de teststof bij de differentiërende spermatogonia geen aanzienlijke cytotoxische effecten teweegbrengt.

De gebruikelijke toedieningswegen zijn orale en intraperitoneale injecties. Ook andere toedieningswegen komen in aanmerking.

Proefdieren

Meestal worden muizen en Chinese hamsters gebruikt. Ook andere zoogdiersoorten komen in aanmerking.

Gezonde, geslachtsrijpe mannetjes worden gebruikt en willekeurig in te behandelen groepen en controlegroepen ingedeeld.

Aantal dieren

Per experimentele groep en per controlegroep worden ten minste vijf mannetjes gebruikt.

Negatieve en positieve controles

In het algemeen moet elk experiment parallelle positieve en negatieve (oplos)middelcontroles omvatten.

Positieve controlestoffen moeten in een geschikte lage dosis (bij voorbeeld mitomycine C, i.p., bij 0,3 mg/kg) worden gebruikt om de gevoeligheid van de test aan te tonen.

Dosisniveaus

Van de testverbinding wordt de maximaal getolereerde dosis of die dosis die enige indicatie van cytotoxiciteit geeft, gebruikt. Als deze dosis een hoge celsterfte tot gevolg heeft, moet een aanvullende lagere dosis waarbij cytotoxiciteit waarneembaar is, worden toegediend. Als het nodig is een dosis/responsverhouding te bepalen, moeten ten minste drie doses worden toegediend (bij voorbeeld om een zwak positieve respons te bevestigen). Niet-toxische stoffen moeten zowel bij enkelvoudige als herhaalde toediening, in de hoogste dosis die toe te passen is, worden getest.

Uitvoering

In het algemeen worden de dieren slechts eenmaal met de testverbinding behandeld. In de groep met de hoogste dosis wordt na de behandeling na drie intervallen een monster genomen. Het centrale bemonsteringsinterval is 24 uur. Aangezien de kinetiek van de celcyclus door de testverbinding kan worden beïnvloed, worden een vroeger en een later bemonsteringsinterval gebruikt die op passende wijze zijn gespreid over een periode van 12 tot 48 uur. Voor aanvullende dosisniveaus dienen de monsters te worden genomen op het gevoeligste tijdstip of, indien dat niet bekend is, 24 uur na de behandeling.

Indien een schema met herhaalde toedieningen wordt gebruikt, dienen de monsters 6 en 24 uur na de laatste behandeling te worden genomen. Eén enkel bemonsteringstijdstip kan worden gebruikt, als dit wetenschappelijk verantwoord is.

Prepareren van testes

Voor de analyse van spermatogoniale mitoses krijgen de dieren een intraperitoneale injectie met een geschikte dosis „spindle"-remmer zoals colchicine. Daarna worden de dieren na een geschikte periode gedood. Voor muizen varieert deze periode van drie tot vijf uur, voor Chinese hamsters kan dit meer dan 5 uur zijn.

De toegepaste techniek is droging aan de lucht. Voor sommige diersoorten kan het noodzakelijk zijn de standaardmethode te wijzigen. Er wordt een celsuspensie gemaakt, die wordt behandeld met een hypotonische oplossing en gefixeerd. De cellen worden op glaasjes gebracht en gekleurd. Voor de microscopische analyse worden de glaasjes gecodeerd.

Analyse

Van ten minste 100 goed gespreide mitotische metafases (50 per testis) met het volledige aantal centromeren worden de structurele chromosoomafwijkingen geanalyseerd. Bovendien kan de verhouding van spermatogoniale mitosen tot eerste en tweede meotische metafasen worden bepaald in een totaal monster van 100 delende cellen per dier om eventuele cytotoxische effecten op te sporen, indien bepaald.

2. GEGEVENS

De gegevens worden in tabellen samengevat. Alle soorten afwijkingen worden voor de controlegroep en de behandelde groep voor elk dier afzonderlijk vermeld. Het totaal aantal geanalyseerde cellen en het totaal aantal afwijkende cellen per groep dienen te worden vermeld. Voor alle parameters wordt het gemiddelde en de standaardafwijking gegeven. De gemiddelde verhouding van spermatogoniale mitosen tot eerste en tweede meotische metafase wordt voor elke proef en controlegroep in tabellen samengevat.

De gegevens worden met behulp van geschikte statistische methoden geëvalueerd.

3. VERSLAGGEVING

3.1. **Verslag van de proefneming**

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

— soort en stam van de mannetjes, leeftijd en gewicht van de mannetjes;

— aantal dieren in de experimentele en controlegroepen;

— proefomstandigheden, gedetailleerde beschrijving van de behandeling, dosisniveaus, (oplos)middelen, gebruikte „spindle"-remmer;

— aantal geanalyseerde cellen per dier in elke groep;

— voor elk behandeld en controledier afzonderlijk: typen en aantallen aberraties;

— statistische evaluatie;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. LITERATUUR

Zie Algemene inleiding — Deel B.

VLEKKENTEST BIJ MUIZEN

1. METHODE

1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. Definitie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. Referentiestoffen

Geen.

1.4. Principe van de onderzoekmethode

Het betreft een in-vivo-test bij muizen waarbij zich ontwikkelende embryo's worden blootgesteld aan chemische stoffen. De cellen in de zich ontwikkelende embryo's waarop de test is gericht, zijn melanoblasten en de genen waarop de test is gericht, zijn die welke de pigmentering van de vachtharen regelen. De zich ontwikkelende embryo's zijn heterozygoot voor een aantal van deze vachtkleurgenen. Door een mutatie in of verlies van (door een verscheidenheid van genetische gebeurtenissen) het dominant alleel van een dergelijk gen in een melanoblast komt het recessief fenotype in de cellen van de afstammelingen tot uiting, waardoor een vlek met een andere kleur wordt gevormd in de vacht van de volgende generatie muizen. Het aantal nakomelingen met deze vlekken wordt geteld en de frequentie ervan vergeleken met het aantal nakomelingen van embryo's die uitsluitend met het oplosmiddel zijn behandeld. Het wordt verondersteld dat de vlekkentest somatische mutaties in foetale cellen detecteert.

1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

Voorbereidingen

Indien mogelijk worden de teststoffen opgelost of gesuspendeerd in een isotonische zoutoplossing. Niet in water oplosbare chemische stoffen worden opgelost of gesuspendeerd in geschikte (oplos)middelen. Het gebruikte (oplos)middel mag niet interfereren met de teststof en geen toxische effecten veroorzaken. Er dienen verse teststofpreparaten te worden gebruikt.

Proefdieren

Muizen van de T-stam (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye, $c^{ch}p/c^{ch}p$; brown b/b; dilute, short ear, d se/d se, piebald spotting, s/s) worden gepaard hetzij met de HT-stam (palled, nonagouti, brachypodie, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, 1n fz/1n fz; pearl pe/pe) of met C57 BL nonagouti, a/a). Andere mogelijke kruisingen zoals tussen NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) en DBA (nonagouti, a/a; brown b/b; dilute d/d) kunnen worden gebruikt op voorwaarde dat ze nonagouti-nakomelingen voortbrengen.

Aantal en geslacht

Er dient een voldoende aantal drachtige vrouwtjes te worden behandeld om voor elk gebruikt dosisniveau een geschikt aantal overlevende nakomelingen te verkrijgen. De omvang van het monster wordt bepaald door het aantal waargenomen vlekken bij de behandelde muizen en door de omvang van controlegegevens. Een negatief resultaat is alleen aanvaardbaar indien ten minste 300 nakomelingen van met de hoogste dosis behandelde vrouwtjes zijn geteld.

Gebruik van positieve en negatieve controles

Er dienen parallelle controlegegevens van uitsluitend met het medium (negatieve controle) behandelde muizen beschikbaar te zijn. Controlegegevens uit het verleden van hetzelfde laboratorium kunnen bij elkaar worden genomen ten einde de gevoeligheid van de test te verhogen, op voorwaarde dat ze homogeen zijn. Indien geen

mutageniteit van de teststof wordt ontdekt, dienen eveneens positieve controlegegevens beschikbaar te zijn die recent in hetzelfde laboratorium zijn verkregen na behandeling met een stof waarvan bekend is dat zij mutageen is in deze test.

Toedieningsweg

De normale toedieningsweg is orale intubatie of intraperitoneale injectie van de drachtige vrouwtjes. In voorkomend geval kan de behandeling ook via inhalatie of andere toedieningswegen geschieden.

Dosisniveaus

Ten minste twee dosisniveaus waarvan één tekenen van toxiciteit of een kleinere nestgrootte laat zien, worden gebruikt. Voor niet-toxische stoffen dient een blootstelling aan de hoogste dosis die is toe te passen te worden gebruikt.

Uitvoering

Normaliter wordt een enkele behandeling gegeven op dag acht, negen of tien van de dracht waarbij dag één de dag is waarop voor het eerst een vaginale plug wordt aangetroffen. Deze dagen stemmen overeen met 7,25, 8,25 en 9,25 dagen na conceptie. Tijdens deze dagen kunnen ook opeenvolgende behandelingen worden gegeven.

Analyse

Drie à vier weken na de geboorte worden de nakomelingen gecodeerd en onderzocht op vlekken. Er dient een onderscheid te worden gemaakt tussen drie klassen van vlekken:

a) witte vlekken op minder dan vijf mm van de mid-ventrale lijn die waarschijnlijk worden veroorzaakt door celsterfte (WMVS),

b) gele, agouti-achtige vlekken, in de buurt van mammae, genitalia, keel, oksels en nierstreek en op het midden van het voorhoofd waarvan verondersteld wordt dat zij worden veroorzaakt door misdifferentiatie (MDS), en

c) willekeurig op de vacht verspreide gepigmenteerde en witte vlekken waarvan verondersteld wordt dat zij worden veroorzaakt door somatische mutaties (RS).

Alle drie klassen moeten worden geteld maar alleen de laatste, RS, heeft een genetisch belang. Moeilijkheden met betrekking tot het onderscheid tussen MDS en RS kunnen worden opgelost door haarmonsters te onderzoeken met de fluorescentiemicroscoop.

Duidelijke macromorfologische abnormaliteiten bij de nakomelingen moeten worden vastgelegd.

2. GEGEVENS

De gegevens worden weergegeven als het totaal aantal getelde nakomelingen en het aantal met een of meer vermoedelijke somatische mutatievlekken. Gegevens van de behandelde en negatieve controlegroep worden met behulp van een geschikte statistische methode vergeleken. De gegevens worden ook per nest weergegeven.

3. VERSLAGGEVING

3.1. Verslag van de proefneming

In het verslag van de proef dienen de volgende gegevens te worden vermeld:

— de voor de kruising gebruikte stam;

— aantal drachtige vrouwtjes in de experimentele en de controlegroep;

— gemiddelde nestgrootte in de experimentele en controlegroepen bij de geboorte en bij het spenen;

— dosisniveau(s) van de teststof;

— gebruikt oplosmiddel;

— dag van de dracht waarop de behandeling is gegeven;

— toedieningsweg;

— totaal aantal nakomelingen en het aantal met WMWS, MDS en RS in de experimentele en de controlegroepen;

— macromorfologische abnormaliteiten;

— dosis-responsverhouding van RS (waar dat van toepassing is);

— statistische evaluatie;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. **LITERATUUR**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

ERFELIJKE TRANSLOCATIE BIJ DE MUIS

1. METHODE

1.1. Inleiding

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. Definitie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. Referentiestoffen

Geen.

1.4. Principe van de onderzoekmethode

Met de erfelijke translocatietest bij de muis worden structurele en numerieke wijzigingen in de geslachtscelchromosomen van zoogdieren gedetecteerd wanneer zij voorkomen in het nageslacht van de eerste generatie. De soorten chromosoomwijzigingen die gedetecteerd worden, zijn reciproke translocaties en indien het vrouwelijk nageslacht wordt meegerekend, verlies van het X-chromosoom. Dragers van translocaties en XO-vrouwtjes vertonen een verminderde vruchtbaarheid die wordt gebruikt voor de selectie van het F_1-nageslacht met het oog op een cytogenetische analyse. Volledige steriliteit wordt veroorzaakt door bepaalde soorten translocaties (X-autosoom en c-t). Translocaties worden cytogenetisch vastgesteld in meiotische cellen in de diakinesemetafase I van mannelijke dieren, hetzij F_1-mannetjes hetzij mannelijk nageslacht van F_1-vrouwtjes. De XO-vrouwtjes zijn cytogenetisch bepaald door de aanwezigheid van slechts 39 chromosomen in beenmergmitoses.

1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

1.6. Beschrijving van de onderzoekmethode

Voorbereiding

De teststoffen worden opgelost in een isotonische zoutoplossing. Onoplosbare stoffen worden opgelost of gesuspendeerd in geschikte (oplos)middelen. Er dienen vers bereide oplossingen van de testverbinding te worden gebruikt. Indien een (oplos)middel wordt gebruikt om het toedienen te vergemakkelijken, mag deze niet interfereren met de teststof en geen toxische effecten veroorzaken.

Toedieningsweg

De normale toedieningswegen zijn orale intubatie of intraperitoneale injectie. Ook andere toedieningswegen kunnen geschikt zijn.

Proefdieren

Deze proef wordt verricht met muizen die gemakkelijk zijn te kweken en cytologisch te analyseren. Er is geen specifieke stam vereist. De gemiddelde nestgrootte bij de stam moet echter groter zijn dan acht en relatief constant. Er worden gezonde geslachtsrijpe dieren gebruikt.

Aantal dieren

Het vereiste aantal dieren wordt bepaald door de spontane translocatiefrequentie en het voor een positief resultaat vereiste minimale inductieniveau.

De proef wordt gewoonlijk uitgevoerd door analyse van het mannelijke F_1-nageslacht. Per dosisgroep dienen ten minste 500 mannelijke F_1-nakomelingen te worden onderzocht. Indien ook vrouwelijke F_1-nakomelingen bij het onderzoek worden betrokken, zijn 300 mannetjes en 300 vrouwtjes vereist.

Gebruik van negatieve en positieve controles

Geschikte controlegegevens, afkomstig van parallelle en historische controles, dienen beschikbaar te zijn. Indien aanvaardbare positieve controlegegevens beschikbaar zijn van experimenten die recent in hetzelfde laboratorium zijn uitgevoerd, kunnen deze resultaten gebruikt worden in plaats van een parallelle positieve controle.

Dosisniveau

Een dosisniveau wordt getest, gewoonlijk de hoogste dosis waarbij een minimaal toxisch effect wordt veroorzaakt zonder dat het reproduktiegedrag of de overleving wordt beïnvloed. Om de dosis-responsverhouding vast te stellen, zijn nog twee lagere doses vereist. Voor niet-toxische stoffen dient blootstelling aan de hoogste dosis die is toe te passen te worden gebruikt.

Uitvoering

Behandeling en paring

Er zijn twee behandelingsschema's beschikbaar. Een enkele toediening van de teststof wordt het meest gebruikt. Ook kan de teststof zeven dagen per week gedurende 35 dagen worden toegediend. Het aantal paringen na de behandeling wordt bepaald door het behandelingsschema en dient voldoende groot te zijn om alle celstadia van de behandelde geslachtscellen te bemonsteren. Na de paringsperiode worden de vrouwtjes in afzonderlijke kooien ondergebracht. Bij de geboorte worden de datum, de nestgrootte en het geslacht van de nakomelingen geregistreerd. Alle mannelijke nakomelingen worden gespeend en de vrouwelijke nakomelingen worden niet gebruikt, tenzij ze worden meegenomen in de proef.

Onderzoek naar heterozygote translocaties

Een van de volgende twee methoden wordt gebruikt:

— vruchtbaarheidsonderzoek van het F_1-nageslacht gevolgd door onderzoek van eventuele translocatiedragers door middel van een cytogenetische analyse.

— Cytogenetische analyse van alle mannelijke F_1-nakomelingen zonder voorafgaande selectie op basis van een vruchtbaarheidsonderzoek.

a) Vruchtbaarheidsonderzoek

Verminderde vruchtbaarheid van een F_1-individu kan worden vastgesteld door observatie van de nestgrootte en/of analyse van de uterusinhoud van vrouwelijke dieren.

Er dienen criteria te worden vastgelegd voor het bepalen van normale en verminderde vruchtbaarheid van de gebruikte muizenstam.

Observatie van de nestgrootte: De te testen F_1-mannetjes worden in afzonderlijke kooien geplaatst met vrouwtjes van dezelfde proef of van de kolonie. De kooien worden dagelijks gecontroleerd vanaf de achttiende dag na de paring. Bij de geboorte worden de nestgrootte en het geslacht van de F_2-nakomelingen geregistreerd; hierna worden de nesten niet meer gebruikt. Indien vrouwelijke F_1-nakomelingen worden onderzocht, worden de F_2-nakomelingen uit kleine nesten voor verder onderzoek behouden. Vrouwelijke translocatiedragers worden opgespoord door cytogenetische analyse van een translocatie in een van de mannelijke nakomelingen. XO-vrouwtjes kunnen worden herkend door een verandering in de geslachtsverhouding van de nakomelingen van 1:1 naar 1:2 mannetjes/vrouwtjes. Bij een sequentiële methode worden normale F_1-dieren niet verder onderzocht indien het eerste F_2-nest een vooraf bepaalde normaalwaarde bereikt of overschrijdt; indien dit niet zo is, wordt een tweede of derde F_2-nest onderzocht.

F_1-dieren die niet als normaal kunnen worden geclassificeerd na observatie van maximaal drie F_2-nesten, worden hetzij verder onderzocht door analyse van de uterusinhoud van vrouwelijke dieren hetzij rechtstreeks onderworpen aan een cytogenetische analyse.

Analyse van de uterusinhoud: De kleinere nestgrootte bij translocatiedragers is een gevolg van de dood van embryo's en dus wijst een hoog aantal dode implantaten op de aanwezigheid van een translocatie in het onderzochte dier. Men laat de te testen F_1-mannetjes elk met twee tot drie vrouwtjes paren. De bevruchting kan worden vastgesteld door middel van een dagelijkse controle op vaginale plugs in de morgen. Veertien tot zestien dagen later worden de vrouwtjes gedood en wordt het aantal levende en dode implantaten in de uteri geregistreerd.

b) Cytogenetische analyse

Testespreparaten worden bereid door droging aan de lucht. Translocatiedragers worden opgespoord op grond van de aanwezigheid van multivalente configuraties tijdens de diakinesemetafase I in primaire spermatocyten. Indien ten minste twee cellen met multivalente associaties kunnen worden waargenomen, vormt dit een bewijs dat het onderzochte dier een translocatiedrager is.

Indien voor het kweken geen selectie is gemaakt, worden alle F_1-mannetjes cytogenetisch onderzocht. Per mannetje dienen ten minste 25 diakinesemetafasen I microscopisch te worden onderzocht. Voor F_1-mannetjes met kleine testes en meiotische afbraak vóór de diakinese of voor F_1-vrouwtjes waarbij XO wordt vermoed, is een onderzoek van de mitotische metafasen, de spermatogonia of het beenmerg noodzakelijk. De aanwezigheid van een ongewoon lang en/of kort chromosoom in tien afzonderlijke cellen is een bewijs voor een bepaalde mannelijke steriele translocatie (c-t type). Sommige mannelijke steriliteit veroorzakende X-autosoomtranslocaties kunnen uitsluitend aan de hand van analyse van de bandering van de mitotische chromosomen worden vastgesteld. De aanwezigheid van 39 chromosomen in alle tien mitoses geldt als bewijs voor een XO-toestand bij een vrouwtje.

2. GEGEVENS

De gegevens worden in tabellarische vorm gepresenteerd.

Voor elke paringsinterval worden de gemiddelde nestgrootte en de geslachtsverhouding bij de geboorte en bij het spenen vermeld voor de paring van de ouders.

Voor vruchtbaarheidsonderzoek van F_1-dieren worden de gemiddelde nestgrootten van alle normale paringen en de afzonderlijke nestgrootte voor F_1-translocatiedragers gegeven. Voor de analyse van de uterusinhoud wordt het gemiddelde aantal levende en dode implantaten na normale paring en het individuele aantal levende en dode implantaten voor elke paring van F_1-translocatiedragers vermeld.

Bij cytogenetische analyse van de diakinesemetafase I worden voor elke translocatiedrager het aantal soorten multivalente configuraties en het totaal aantal cellen genoteerd.

Voor steriele F_1-dieren wordt het totaal aantal paringen en de duur van de paartijd vermeld. Het gewicht van de testes en gegevens van de cytogenetische analyse worden opgegeven.

Voor XO-vrouwtjes dienen de gemiddelde nestgrootte, geslachtsverhouding van F_2-nakomelingen en resultaten van de cytogenetische analyse te worden vermeld.

Indien mogelijke F_1-translocatiedragers vooraf geselecteerd zijn op basis van vruchtbaarheidsonderzoekingen, dienen de tabellen te vermelden hoeveel ervan bevestigde translocatieheterozygoten waren.

De gegevens van negatieve en positieve controleproeven worden op dezelfde manier voorgesteld.

3. VERSLAGGEVING

3.1. Verslag van de proefneming

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

— gebruikte stam, leeftijd van de dieren, gewicht van behandelde dieren;

— aantal ouderdieren van elk geslacht in experimentele en controlegroepen;

— proefomstandigheden, gedetailleerde beschrijving van de behandeling, dosisniveaus, oplosmiddelen, paringsschema;

— aantal en geslacht van de nakomelingen per vrouwtje, aantal en geslacht van voor translocatieanalyse gekweekte nakomelingen;

— tijdstip en criteria voor de translocatieanalyse;

— aantal en nauwkeurige beschrijving van translocatiedragers, inclusief gegevens over het kweken en de uterusinhoud (wanneer dat van toepassing is);

— cytogenetische methoden en resultaten van de microscopische analyse, bij voorkeur met foto's;

— statistische evaluatie;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. Evaluatie en interpretatie

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. LITERATUUR

Zie Algemene inleiding — Deel B.

DEEL C: METHODEN VOOR DE BEPALING VAN DE ECOTOXICITEIT

ALGEMENE INLEIDING

De hieronder beschreven testmethoden dienen voor de bepaling van sommige van de ecotoxicologische eigenschappen, vermeld in bijlage VIII van Richtlijn 79/831/EEG. Kennisgevers worden erop geattendeerd dat er geen methoden voor de bepaling van onderstaande, bij niveau 1 van bijlage VIII bedoelde eigenschappen in de tekst zijn opgenomen:

— verlengd toxiciteitsonderzoek met Daphnia magna,

— onderzoeking op een hogere plant,

— verlengd toxiciteitsonderzoek op vis,

— onderzoeking inzake soortaccumulatie.

Zodra passende testmethoden voor de bepaling van deze eigenschappen zijn uitgewerkt, zullen zij worden gepubliceerd in de vorm van een nadere aanpassing aan de vooruitgang van de techniek. In de tussentijd moeten kennisgevers passende, internationaal erkende methoden gebruiken, waarvan aan de bevoegde instantie opgave moet worden gedaan.

REMMINGSTEST VOOR ALGEN

1. METHODE

1.1. Inleiding

Het doel van deze test is het bepalen van de effecten van een stof op de groei van een eencellige groene algensoort. Met betrekkelijk snelle proeven kunnen de effecten over verscheidene generaties worden bepaald. Deze methode kan worden aangepast voor toepassing op verschillende eencellige algensoorten, in welk geval een beschrijving van de gebruikte methoden bij het testrapport moet worden gevoegd.

Deze methode is zeer gemakkelijk toepasbaar voor in water oplosbare stoffen die onder de testomstandigheden waarschijnlijk in het water blijven.

Voor stoffen die beperkt oplosbaar zijn in het testmedium is het wellicht niet mogelijk de EC_{50} kwantitatief te bepalen (zie definitie hieronder).

Deze methode kan worden gebruikt voor stoffen die de meting van algengroei niet rechtstreeks storen.

De volgende informatie kan van nut zijn voor de uitvoering van deze test:

— oplosbaarheid in water,

— dampdruk,

— structuurformule,

— zuiverheid,

— chemische stabiliteit tegenover water en licht,

— analysemethoden voor de kwantitatieve bepaling van de stof in water,

— pKa-waarde,

— verdelingscoëfficiënt over n-octanol/water,

— resultaten van een eenvoudige test op de biologische afbreekbaarheid.

1.2. Definities en eenheden

Celconcentratie is het aantal cellen per ml.

Groei is de toename van de celconcentratie gedurende de testperiode.

Groeisnelheid is de toename van de celconcentratie per tijdseenheid.

EC_{50} is in deze methode die concentratie teststof die ten opzichte van de controle leidt tot een afname met 50 % van hetzij de groei, hetzij de groeisnelheid.

NOEC (no observed effect concentration) is in deze methode de hoogste in de test gebruikte concentratie waarbij de gemeten parameter(s) geen noemenswaardige remming van de groei ten opzichte van de controle aangeven.

1.3. Referentiestoffen

Een referentiestof kan worden getest om te achterhalen of de testomstandigheden voldoen. Indien een referentiestof wordt gebruikt, moeten de resultaten in het testrapport worden vermeld. Als referentiestof kan kaliumdichromaat worden gebruikt.

1.4. Principe van de testmethode

Exponentieel groeiende culturen van geselecteerde groene algen worden over verscheidene generaties onder gedefinieerde omstandigheden aan verschillende concentraties teststof blootgesteld. De groeiremming ten opzichte van een controlecultuur wordt bepaald gedurende een vastgestelde periode.

1.5. **Kwaliteitsnormen**

1.5.1. *Voorwaarden voor de geldigheid van de test*

De celconcentratie in de controleculturen moet binnen drie dagen ten minste met een factor zestien zijn toegenomen.

Het verdwijnen van de teststof uit het water naar de biomassa maakt de test niet zonder meer ongeldig.

1.6. **Beschrijving van de methode**

1.6.1. *Voorbereidingen*

1.6.1.1. Apparatuur en materialen

— Gangbare laboratoriumuitrusting.

— Kolven met een geschikte inhoud (bij voorbeeld wanneer het volume van de testoplossing 100 ml bedraagt, komen erlenmeyers van 250 ml in aanmerking).

— Kweekapparatuur: kast of kamer waarin de temperatuur tussen 21 en 25 °C op ± 2 °C kan worden gehandhaafd en die continu gelijkmatig kan worden belicht in het spectrale gebied van 400—700 nm. (Aanbevolen wordt een quantumstroom van $0{,}72 \times 10^{20}$ fotonen/m^2.s ± 20 %. Deze quantumstroom komt overeen met 120 µE/m^2.s en kan worden verkregen met een universele witte fluorescentielamp (lichttemperatuur ongeveer 4 200 K) die ongeveer 8 000 lux levert, gemeten met een bolvormige collector).

— Apparatuur voor het bepalen van celconcentraties, bij voorbeeld elektronische deeltjesteller, microscoop met telkamer, fluorimeter, spectrofotometer, colorimeter (opmerking: om bij gebruik van een spectrofotometer betrouwbare metingen te doen bij lage celconcentraties, kan het nodig zijn cuvetten met een lichtweglengte van ten minste 4 cm te gebruiken).

1.6.1.2. Algenmedium

Het volgende medium wordt aanbevolen:

NH_4Cl:	15	mg/l,
$MgCl_2.6H_2O$:	12	mg/l,
$CaCl_2.2H_2O$:	18	mg/l,
$MgSO_4.7H_2O$:	15	mg/l,
KH_2PO_4:	1,6	mg/l,
$FeCl_3.6H_2O$:	0,08	mg/l,
$Na_2EDTA.2H_2O$:	0,1	mg/l,
H_3BO_3	0,185	mg/l,
$MnCl_2.4H_2O$:	0,415	mg/l,
$ZnCl_2$:	3×10^{-3}	mg/l,
$CoCl_2.6H_2O$:	$1{,}5 \times 10^{-3}$	mg/l,
$CuCl_2.2H_2O$:	10^{-5}	mg/l,
$Na_2MoO_4.2H_2O$:	7×10^{-3}	mg/l,
$NaHCO_3$:	50	mg/l.

De pH van dit medium is na tot evenwicht komen met lucht ongeveer 8.

Met bovenstaande aanbeveling worden andere media niet uitgesloten, mits de volgende grenzen voor belangrijke bestanddelen in acht zijn genomen:

P:	$\leqslant$ 0,7 mg/l,
N:	$\leqslant$ 10 mg/l,
chelaatvormers:	$\leqslant 10^{-3}$ mmol/l,
hardheid (Ca + Mg):	$\leqslant$ 0,6 mmol/l.

Het aanbevolen medium en het in referentie (1) gegeven medium voldoen aan deze eisen.

1.6.1.3. Proeforganismen

Selectie van soorten

Als groene algen verdient een snelgroeiende soort welke geschikt is om te kweken en te testen de voorkeur. De volgende soorten worden geschikt geacht:

— Selenastrum capricornutum ATCC 22662,

— Scenedesmus subspicatus 86.81 SAG,

— Chlorella vulgaris CCAP 211/11b.

Indien een andere soort wordt gebruikt, moet de stam worden vermeld.

1.6.1.4. Proefopzet

Celconcentratie bij de aanvang van de test

Aanbevolen wordt bij de aanvang van de test een celconcentratie in de testculturen te nemen van ongeveer 10^4 cellen/ml voor Selenastrum capricornutum en Scenedesmus subspicatus. Bij gebruik van andere soorten moet de biomassa ongeveer even groot zijn.

Concentraties teststof

Het concentratiegebied waarin effecten verwacht worden, wordt bepaald op basis van oriënterende proeven. Voor de test worden ten minste vijf concentraties in een meetkundige reeks gekozen. De laagste concentratie mag geen waarneembaar effect hebben op de algengroei. De hoogste testconcentratie moet de groei voor ten minste 50 % remmen ten opzichte van de controle en bij voorkeur zelfs volledig stoppen.

Herhalingen en controles

Het experiment dient bij voorkeur uitgevoerd te worden met triplo's van elke testconcentratie en zo mogelijk tweemaal zoveel controles. Indien de redenen daarvoor worden aangegeven, kan de proefopzet zodanig worden gewijzigd dat het aantal concentraties wordt verhoogd en het aantal herhalingen per concentratie wordt verminderd.

Indien voor het oplossen van de teststof een hulpstof wordt gebruikt, moeten in de proefopzet extra controles worden opgenomen die de hulpstof in de hoogste in de test gebruikte concentraties bevatten.

1.6.2. *Uitvoering van de test*

Dit onderdeel bevat aanwijzingen voor het testen van goed oplosbare en slecht oplosbare stoffen en van vluchtige stoffen.

1.6.2.1. Het testen van goed in water oplosbare stoffen

Testculturen met daarin de gewenste concentraties teststof en de gewenste hoeveelheid algen-entmateriaal worden bereid door hoeveelheden voorraadoplossingen van de teststof en van de algensuspensie te verdunnen met gefiltreerd algenmedium.

De kweekflessen worden geschud en in het kweekapparaat geplaatst. Tijdens de test moeten de algen in suspensie worden gehouden en moet de overdracht van kooldioxide worden bevorderd. Hiertoe kan worden geschud, geroerd of belucht. De culturen dienen te worden gehouden op een temperatuur tussen 21 en 25 °C, geregeld op ± 2 °C.

De celconcentratie in elke kolf wordt tenminste 24, 48 en 72 uur na de aanvang van de test bepaald. Voor het bepalen van de achtergrond bij het gebruik van deeltjestellers of als blanco bij het gebruik van een spectrofotometer wordt gefiltreerd algenmedium gebruikt.

De pH wordt gemeten bij de aanvang van de testen en na 72 uur.

De pH van de oplossingen mag tijdens de test normaal gesproken niet meer dan één eenheid afwijken.

1.6.2.2. Het testen van stoffen met beperkte oplosbaarheid in water

Wanneer de oplosbaarheid van de teststof en de hoogste in de test gebruikte concentratie van dezelfde orde van grootte zijn, zijn slechts geringe afwijkingen van bovenstaande procedure nodig voor het bereiden van de testoplossingen. Een verzadigde oplossing kan dienen als voorraadoplossing van de teststof. Een andere mogelijkheid is de teststof, voordat de algensuspensie wordt toegevoegd, tot de gewenste concentratie in het algenmedium op te lossen.

Voorraadoplossingen van stoffen met een geringe oplosbaarheid in water kunnen worden bereid door mechanisch dispergeren of door het gebruik van hulpstoffen met een lage toxiciteit voor algen, zoals organische oplosmiddelen, emulgatoren of dispergeermiddelen. Bij gebruik van een hulpstof mag de concentratie daarvan niet hoger zijn dan 100 mg/l en moeten in de proefopzet extra controles worden opgenomen waarin de hulpstof aanwezig is in de hoogste in de testoplossing aanwezige concentratie.

1.6.2.3. Het testen van vluchtige stoffen

Tot op heden is er geen algemeen aanvaarde manier om vluchtige stoffen te testen. Wanneer van een stof bekend is dat deze de neiging heeft om te verdampen, kan gebruik worden gemaakt van afgesloten testkolven met een vergrote bovenruimte. Op deze methode zijn variaties voorgesteld (zie referentie (1)).

De hoeveelheid stof die in de testoplossing aanwezig blijft, dient voor zover mogelijk te worden bepaald. Bij de interpretatie van de resultaten van testen met vluchtige chemicaliën in gesloten systemen moet uiterste voorzichtigheid worden betracht.

2. GEGEVENS EN UITWERKING

De gemeten celconcentraties in de testculturen en in de controles worden samen met de concentraties teststof en het tijdstip van de meting in een tabel genoteerd. De gemiddelde waarde van de celconcentratie voor elke concentratie teststof en voor de controles wordt uitgezet tegen de tijd; dit levert de groeicurves op.

Voor het bepalen van de concentratie-effectrelatie worden de twee volgende methoden toegepast.

2.1. **Vergelijking van de oppervlakten onder de groeicurves**

De oppervlakte onder de groeicurve kan worden berekend met behulp van de formule:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

waarin:

A = oppervlakte,
N_0 = nominaal aantal cellen per ml op tijdstip t_0,
N_1 = gemeten aantal cellen per ml op tijdstip t_1,
N_n = gemeten aantal cellen per ml op t_n,
t_1 = tijdstip van de eerste meting na de aanvang van de test,
t_n = tijdstip van de n^{de} meting na de aanvang van de test.

Het percentage remming van de celgroei bij elke concentratie teststof (I_A) wordt berekend als het verschil tussen de oppervlakte onder de groeicurve van de controle (A_c) en de oppervlakte onder de groeicurve bij elke concentratie teststof (A_t), of wel:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

De I_A-waarden worden op halflogaritmisch papier of op halflogaritmisch probitpapier uitgezet tegen de bijbehorende concentraties. Wanneer de punten zijn uitgezet op probitpapier wordt daardoor op het oog een rechte lijn getrokken; wanneer een log-normale verdeling van waarden kan worden aangenomen, kan ook een berekende regressielijn worden getrokken.

Een EC_{50}-waarde ontstaat uit de afsnede van de concentratieas door de lijn die vanuit het snijpunt van de (regressie) lijn met de lijn I_A = 50 % naar de abscis wordt getrokken.

Om duidelijk aan te geven dat deze waarde volgens deze berekeningsmethode is verkregen, wordt voorgesteld het symbool E_bC_{50} te gebruiken. In relatie met deze methode waarin metingen bij 24, 48 en 72 uur zijn voorgeschreven, wordt het symbool E_bC_{50} (0 – 72 h).

Ook andere EC-waarden zoals de E_bC_{10} kunnen uit de grafiek van I_A tegen de logconcentratie worden afgeleid.

2.2. **Vergelijking van groeisnelheden**

De gemiddelde specifieke groeisnelheid (μ) voor exponentieel groeiende culturen kan als volgt worden berekend:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$

In plaats daarvan kan de gemiddelde specifieke groeisnelheid worden afgeleid uit de helling van de regressielijn in een grafiek van ln N tegen de tijd.

De procentuele afname van de gemiddelde groeisnelheid bij elke concentratie teststof vergeleken met de controlewaarde wordt uitgezet tegen de logaritme van de concentratie. De bijbehorende EC_{50} kan uit de aldus ontstane grafiek worden afgelezen. Om duidelijk aan te geven dat de EC_{50} volgens deze methode is verkregen, wordt voorgesteld het symbool E_rC_{50} te gebruiken. De meettijden moeten worden aangegeven; indien de waarde bij voorbeeld betrekking heeft op observatietijden van 24 en 48 uur, wordt het symbool E_rC_{50} (24—48 h).

Opmerking: de groeisnelheid is een logaritmische grootheid en kleine veranderingen in de groeisnelheid kunnen leiden tot grote veranderingen in de biomassa. E_bC en E_rC zijn daarom niet getalsmatig vergelijkbaar.

3. **VERSLAGGEVING**

Het testrapport moet, indien mogelijk, bevatten:

— Teststof: scheikundige gegevens ter identificatie.

— Testorganismen: herkomst, laboratoriumkweek, stamnummer, kweekmethode.

— Testomstandigheden:

  — datum van begin en einde van de test en duur,

  — temperatuur,

— samenstelling van het medium,

— kweekapparatuur,

— pH van oplossingen bij het begin en bij het eind van de test (indien afwijkingen in de pH van meer dan 1 eenheid worden waargenomen, moet een verklaring worden gegeven),

— hulpstof en methode gebruikt voor het oplossen van teststof en concentratie van de hulpstof in de testoplossingen,

— lichtintensiteit en lichtkwaliteit,

— testconcentraties (gemeten of nominaal).

— Resultaten:

— celconcentratie voor elke kolf bij elk meetpunt en methode voor het meten van de celconcentratie,

— gemiddelde waarden van celconcentraties,

— groeicurves,

— grafische weergave van de concentratie-effectrelatie,

— EC-waarden en berekeningsmethoden,

— NOEC,

— andere waargenomen effecten.

4. REFERENTIES

(1) OESO, Parijs, 1981, *Testrichtlijn 201,* Besluit C(81) 30 def. van de Raad.

(2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge Scenedesmus subspicatus", in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie,* ecomed, Landsberg, 1986.

Aanhangsel

VOORBEELD VAN EEN PROCEDURE VOOR HET KWEKEN VAN ALGEN

Algemene opmerkingen

Het doel van het kweken op basis van de volgende werkwijze is het verkrijgen van algenculturen voor toxiciteitsproeven.

Met passende methoden moet worden verzekerd dat de algenculturen niet zijn geïnfecteerd met bacteriën (ISO 4833). Culturen die onder aseptische omstandigheden zijn gekweekt, kunnen wenselijk zijn, maar het is van wezenlijk belang dat de culturen slechts één algensoort bevatten.

Alle handelingen worden bij voorkeur onder steriele omstandigheden uitgevoerd om besmetting met bacteriën of andere algen te voorkomen.

Apparatuur en materialen

Zie 1.6.1: Voorbereidingen en proeforganismen.

Werkwijzen voor het verkrijgen van algenculturen

Bereiding van voedingsoplossingen (media)

Alle voedingszouten van het medium worden bereid als geconcentreerde voorraadoplossingen en donker en koud bewaard. Deze oplossingen worden gesteriliseerd door filtreren of door behandeling in een autoclaaf.

Het medium wordt bereid door de juiste hoeveelheid voorraadoplossing aan steriel gedestilleerd water toe te voegen, waarbij ervoor wordt gezorgd dat er geen infecties optreden. Voor een vaste voedingsbodem wordt 0,8 % agar toegevoegd.

Voorraadcultuur

De voorraadculturen zijn kleine algenculturen die regelmatig in een vers medium worden overgebracht en die dienen als entmateriaal. Indien de culturen niet regelmatig worden gebruikt, worden zij op buizen met schuingestolde agar uitgestreken. Deze worden ten minste eenmaal per twee maanden op verse voedingsbodem overgeënt.

De voorraadculturen worden gekweekt in erlenmeyers met het geschikte medium (volume ongeveer 100 ml). Wanneer de algen bij 20 °C bij voortdurende belichting worden geïncubeerd, is wekelijks overbrengen nodig.

Bij het overbrengen wordt een hoeveelheid „oude" cultuur met steriele pipetten overgebracht in een kolf met vers medium, zodat met de snelgroeiende soorten de beginconcentratie ongeveer 100 keer kleiner is dan die in de oude cultuur.

De groeisnelheid van een soort kan worden bepaald met behulp van de groeicurve. Indien deze bekend is, kan een schatting worden gemaakt van de dichtheid waarbij de cultuur naar nieuw medium moet worden overgebracht. Dit dient te geschieden voordat de cultuur de afstervingsfase bereikt.

Voorcultuur

De bedoeling van de voorcultuur is het geven van een hoeveelheid algen die geschikt is voor het enten van de testculturen. De voorcultuur wordt geïncubeerd onder de testomstandigheden en gebruikt wanneer de groei nog exponentieel is, doorgaans na een incubatieperiode van ongeveer drie dagen. Algenculturen die misvormde of afwijkende cellen bevatten, mogen niet gebruikt worden.

TOXICITEIT VOOR REGENWORMEN

TEST MET KUNSTMATIGE GROND

1. METHODE

1.1. Inleiding

In deze laboratoriumtoets wordt de te onderzoeken stof toegevoegd aan kunstmatige grond waarin gedurende veertien dagen regenwormen worden geplaatst. Na deze veertien dagen (en naar keuze ook al na zeven dagen) wordt het letale effect van de stof op de regenwormen onderzocht. Met deze test kan betrekkelijk snel een indruk worden verkregen van het effect van chemicaliën op regenwormen bij opname via de huid en via het voedsel.

1.2. Definitie en eenheid

LC_{50}: De geschatte concentratie van een stof die de dood van 50 % van de proefdieren gedurende de testperiode tot gevolg heeft.

1.3. Referentiestof

Op gezette tijden wordt een referentiestof getoetst om aan te tonen dat de gevoeligheid van het testsysteem niet wezenlijk is veranderd.

Als referentiestof wordt aanbevolen chlooraceetamide van analytische kwaliteit.

1.4. Principe van de test

Grond is een variabel medium en daarom wordt voor deze proef een nauwkeurig gedefinieerde kunstmatige leemgrond gebruikt. Volwassen regenwormen van de soort Eisenia foetida (zie de opmerking in het aanhangsel) worden gehouden in deze kunstmatige grond, die is behandeld met verschillende concentraties van de te onderzoeken stof. De kunstgrond wordt na veertien dagen (en naar keuze ook na zeven dagen) vanaf het begin van de proef op een schaal uitgespreid en het aantal overlevende regenwormen bij elke concentratie wordt geteld.

1.5. Kwaliteitsnormen

De opzet is zodanig dat de test ten aanzien van het testsubstraat en het organisme zo reproduceerbaar mogelijk is. Indien de sterfte in de controles aan het eind van de proef hoger is dan 10 %, is de test ongeldig.

1.6. Beschrijving van de methode

1.6.1. *Materiaal*

1.6.1.1. Testsubstraat

Als basis-testsubstraat wordt goed gedefinieerde kunstmatige grond gebruikt.

a) Basissubstraat (percentages aangegeven in droog gewicht)
   - 10 % veenmosturf (zo dicht mogelijk bij pH 5,5 – 6,0, zonder zichtbare plantenresten en fijngemalen);
   - 20 % kaolienklei met zo mogelijk meer dan 50 % kaoliniet;
   - ongeveer 69 % industrieel kwartszand (overwegend fijn zand met meer dan 50 % deeltjesgrootte 0,05 – 0,2 mm). Indien de stof onvoldoende dispergeerbaar is in water, wordt per testpot 10 g zand achtergehouden om later met de teststof te kunnen worden gemengd;
   - ongeveer 1 % calciumcarbonaat ($CaCO_3$), poedervormig, chemisch zuiver, dat wordt toegevoegd om de pH op 6,0 ± 0,5 te brengen.

b) Testsubstraat

   Het testsubstraat bevat het basissubstraat, de teststof en gedeïoniseerd water.

   Het vochtgehalte bedraagt 25 tot 45 % van het drooggewicht van het basissubstraat. Het vochtgehalte van het substraat wordt bepaald door een monster bij 105 °C tot constant gewicht te drogen. De kunstmatige grond moet zover nat worden gemaakt dat er net geen water op blijft staan. Er moet zorgvuldig worden gemengd, zodat een gelijkmatige verdeling van de te onderzoeken stof over het substraat wordt verkregen. Aangegeven moet worden op welke wijze de te onderzoeken stof door het substraat is gemengd.

c) Controlesubstraat

   Het controlesubstraat bevat het basissubstraat en water. Indien een hulpstof is gebruikt, moet een extra controle worden gedaan met daarin dezelfde hoeveelheid van de hulpstof.

1.6.1.2. Testpotten

Er wordt gebruik gemaakt van glazen potten met een inhoud van ongeveer 1 liter (afgesloten met plastic deksels, schotels of plastic folie met luchtgaten), die worden gevuld met een hoeveelheid nat test- of controlesubstraat die overeenkomt met 500 g droog substraat.

1.6.2. *Testomstandigheden*

De potten worden geplaatst in klimaatkamers bij een temperatuur van 20 ± 2 °C onder continu licht. De lichtintensiteit dient 400 tot 800 lux te bedragen. De testduur bedraagt veertien dagen maar de sterfte kan indien gewenst ook al na zeven dagen worden bepaald.

1.6.3. *Werkwijze*

Testconcentraties

De concentraties van de te onderzoeken stof worden uitgedrukt als gewicht van de stof per drooggewicht basissubstraat (mg/kg).

Oriënterende toets

Het concentratiegebied dat leidt tot een sterfte tussen 0 tot 100 % kan worden bepaald in een oriënterende toets met behulp waarvan de reeks concentraties voor de definitieve test kan worden vastgesteld.

In de oriënterende toets wordt de te onderzoeken stof getest bij de volgende concentraties: 1 000, 100, 10, 1 en 0,1 mg stof per kg testsubstraat (drooggewicht).

Als er een volledige definitieve toets wordt uitgevoerd, kan voor de oriënterende toets worden volstaan met uitvoering in enkelvoud, dat wil zeggen met één pot per concentratie en één voor de controle zonder de te onderzoeken stof, elk met tien wormen.

Definitieve toets

De resultaten van de oriënterende toets worden gebruikt voor het kiezen van ten minste vijf concentraties in een meetkundige reeks die juist het gebied tussen 0 en 100 % sterfte bestrijken en onderling met een constante factor van ten hoogste 1,8 verschillen.

Door middel van de toets met deze reeks concentraties moeten de LC_{50}-waarde en de bijbehorende betrouwbaarheidsgrenzen zo nauwkeurig mogelijk kunnen worden geschat.

In de definitieve toets worden ten minste vier potten per concentratie en vier controles zonder de te onderzoeken stof, elk met tien wormen, onderzocht. De resultaten van deze parallelle toetsen worden gegeven als een gemiddelde met een standaarddeviatie.

Wanneer twee opeenvolgende concentraties, met een onderlinge verhouding van 1,8, slechts respectievelijk 0 en 100 % sterfte geven, zijn deze twee waarden voldoende om het gebied aan te geven waarbinnen de LC_{50} ligt.

Mengen van het basissubstraat en de teststof

Het testsubstraat wordt zoveel mogelijk bereid zonder andere hulpstoffen dan water. Vlak voor het begin van de test wordt een oplossing, emulsie of dispersie van de te onderzoeken stof in gedeïoniseerd water of een ander oplosmiddel met het basissubstraat gemengd of daarover gelijkmatig verdeeld met een fijne chromatografische of soortgelijke sproeier.

Indien de te onderzoeken stof onoplosbaar is in water, kan deze worden opgelost in een zo klein mogelijk volume van een geschikt organisch oplosmiddel (bij voorbeeld hexaan, aceton of chloroform). Alleen gemakkelijk verdampende oplosmiddelen mogen worden gebruikt voor het oplossen, dispergeren of emulgeren van de te onderzoeken stof. Het testsubstraat wordt voor het gebruik geventileerd. De hoeveelheid verdampt water wordt daarna weer aangevuld.

De controle moet van elke hulpstof dezelfde hoeveelheid bevatten. Indien de te onderzoeken stof niet oplosbaar, dispergeerbaar of emulgeerbaar is in organische oplosmiddelen, wordt 10 g van een mengsel van fijn gemalen kwartszand en een hoeveelheid van de te onderzoeken stof die nodig is voor de behandeling van 500 g droog gewicht aan kunstmatige grond gemengd met 490 g droog gewicht aan basissubstraat.

Voor elke testportie wordt een hoeveelheid nat testsubstraat die overeenkomt met 500 g droog gewicht in een glazen pot gebracht en worden tien regenwormen, die 24 uur in een soortgelijk nat basissubstraat zijn geconditioneerd en voor gebruik snel zijn gewassen en met filtreerpapier van overtollig water zijn ontdaan, bovenop het testsubstraat geplaatst.

De potten worden afgedekt met geperforeerde plastic deksels, schalen of folie om uitdrogen van het substraat te voorkomen en worden vervolgens veertien dagen onder de testomstandigheden gehouden.

De bepalingen worden gedaan veertien dagen (en eventueel zeven dagen) na het begin van de test. Het substraat wordt uitgespreid op een plaat van glas of roestvrij staal. De regenwormen worden onderzocht en het aantal overlevende wormen wordt bepaald. Regenwormen worden als dood aangemerkt indien zij niet reageren op een zachte mechanische prikkel op de kop.

Indien onderzoek na zeven dagen plaatsvindt, wordt het substraat terug in de pot gedaan en worden de overlevende regenwormen weer bovenop het testsubstraat geplaatst.

1.6.4. *Testorganismen*

De testorganismen zijn volwassen Eisenia foetida (zie opmerking in de bijlage), ten minste twee maanden oud met clitellum, nat gewicht 300—600 mg (voor kweekmethode zie aanhangsel).

2. GEGEVENS

2.1. Verwerking van de resultaten

De concentraties van de onderzochte stof worden vermeld in samenhang met de bijbehorende percentages dode regenwormen.

Wanneer de gegevens zich daartoe lenen, worden de LC_{50}-waarde en de betrouwbaarheidsgrenzen ($p = 0,05$) bepaald volgens standaardmethoden (Litchfield en Wilcoxon, 1949 of gelijkwaardige methode). De LC_{50} wordt weergegeven in mg te onderzoeken stof per kg testsubstraat (droog gewicht).

Indien de helling van de concentratiecurve te steil is voor de berekening van de LC_{50}, is een grafische schatting van deze waarde voldoende.

Wanneer twee opeenvolgende concentraties met een onderlinge verhouding van 1,8 slechts respectievelijk 0 % en 100 % sterfte geven, zijn deze waarden voldoende voor het aangeven van het gebied waarbinnen de LC_{50} ligt.

3. VERSLAGGEVING

3.1. Testrapport

Het testrapport moet, indien mogelijk, bevatten:

— een verklaring dat de test is uitgevoerd overeenkomstig de bovenvermelde kwaliteitsnormen;

— uitgevoerde toetsen (oriënterende toets en/of definitieve toets);

— nauwkeurige beschrijving van de testomstandigheden of verklaring dat de test is uitgevoerd overeenkomstig deze methode; alle afwijkingen worden vermeld;

— nauwkeurige beschrijving van de wijze waarop de te onderzoeken stof door het basissubstraat is gemengd;

— gegevens over de testorganismen (soort, leeftijd, gemiddeld gewicht en variatie in gewicht, houd- en kweekomstandigheden, leverancier);

— gebruikte methode voor de bepaling van de LC_{50};

— testresultaten met inbegrip van alle gebruikte gegevens;

— beschrijving van waargenomen symptomen of wijzigingen in het gedrag van de testorganismen;

— sterfte in de controleproeven;

— LC_{50} of hoogste geteste concentratie zonder sterfte dan wel laagste geteste concentratie met een sterfte van 100 %, veertien dagen (en eventueel zeven dagen) na de start van de test;

— grafiek van de concentratie-responscurve;

— resultaten verkregen met de referentiestof, in samenhang met de onderhavige test dan wel uit eerdere kwaliteitsborging.

4. REFERENTIES

(1) OESO, Parijs, 1981, *Testrichtlijn 207,* Besluit C(81) 30 def. van de Raad.

(2) Edwards, C. A., en Lofty, J. R., 1977, *Biology of Earthworms,* Chapman and Hall, London, 331 blz.

(3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Écologie et Systématique,* Institut National de la Recherche Agronomique, 671 blz.

(4) Litchfield, J. T., en Wilcoxon, F., A simplified method of evaluating dose-effect experiments, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 96, 1949, blz. 99.

(5) Commission of the European Communities, *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms,* Report EUR 8714 EN, 1983.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxizitätstest am Regenwurm Eisenia foetida in künstlichem Boden", in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie,* ecomed, Landsberg, 1986.

Aanhangsel

Kweken en houden van de wormen vóór de test

Voor het kweken worden 30 tot 50 volwassen wormen in een kweekbak met vers substraat gebracht en na veertien dagen daaruit verwijderd. Deze dieren kunnen worden gebruikt voor verder kweken. De uit de cocons gekomen regenwormen worden voor het onderzoek gebruikt wanneer ze volwassen zijn (onder de voorgeschreven omstandigheden na twee tot drie maanden).

Houd- en kweekomstandigheden

Klimaatkamer: temperatuur 20 ± 2 °C, zo mogelijk met continu licht (intensiteit 400—800 lux).

Kweekbakken: geschikte ondiepe bakken met een inhoud van 10 tot 20 l.

Substraat: Eisenia foetida kan worden gekweekt in verschillende dierlijke uitwerpselen. Aanbevolen als kweekmedium wordt een mengsel van 50 volumeprocent turf en 50 % koemest of paardemest. Het medium moet een pH hebben van 6 tot 7 (bij te stellen met calciumcarbonaat) en een lage-ionengeleiding (lager dan 6 mmho's of 0,5 % zoutconcentratie). Het substraat dient vochtig maar niet te nat te zijn.

Naast de aangegeven methode kunnen ook andere procedures die goede resultaten geven worden gebruikt.

Opmerking: Eisenia foetida bestaat in twee ondersoorten die door sommige taxonomen als soorten worden aangemerkt (Bouche, 1972). Deze zijn morfologisch overeenkomstig, maar de ene, Eisenia foetida foetida, heeft kenmerkende dwarse strepen of banden op de segmenten terwijl de andere, Eisenia foetida andrei, deze niet heeft en een onregelmatige roodachtige kleur heeft. Zo mogelijk dient Eisenia foetida andrei te worden gebruikt. Andere soorten kunnen worden gebruikt indien de benodigde methodiek beschikbaar is.

BIOLOGISCHE AFBRAAK

ZAHN-WELLENS TEST

1. METHODE

1.1. Inleiding

Het doel van deze methode is de bepaling van de uiteindelijke biologische afbreekbaarheid van in water oplosbare, niet-vluchtige organische stoffen, wanneer deze in een statische proef aan betrekkelijk hoge concentraties micro-organismen worden onderworpen.

Aan de gesuspendeerde vaste stoffen kan fysisch-chemische adsorptie plaatsvinden en hiermee moet bij het interpreteren van de resultaten rekening worden gehouden (zie 3.2).

De te onderzoeken stoffen worden gebruikt in concentraties, die overeenkomen met DOC-waarden tussen 50 en 400 mg/liter of COD-waarden tussen 100 en 1 000 mg/liter (DOC = opgeloste organische koolstof; COD = chemisch zuurstofverbruik). Deze betrekkelijk hoge concentraties hebben het voordeel dat ze analytisch betrouwbaar zijn. Verbindingen met toxische eigenschappen kunnen het afbraakproces vertragen of verhinderen.

In deze methode wordt door middel van meting van de concentratie opgeloste organische koolstof of het chemisch zuurstofverbruik de uiteindelijke biologische afbraak van de teststof bepaald.

Het gelijktijdig toepassen van een specifieke analytische methode biedt de mogelijkheid de primaire biologische afbraak van de stof (verdwijning van de oorspronkelijke chemische structuur) te bepalen.

Deze methode is alleen toepasbaar op die organische stoffen die bij de in de test gebruikte concentratie:

— onder de testomstandigheden in water oplosbaar zijn,

— onder de testomstandigheden een verwaarloosbare dampspanning hebben,

— geen remmende werking op bacteriën hebben,

— slechts in beperkte mate worden geadsorbeerd aan de testapparatuur,

— niet door schuimvorming uit de testoplossing verdwijnen.

Gegevens over de onderlinge verhoudingen van de belangrijkste componenten van het testmateriaal kunnen van nut zijn bij het interpreteren van de resultaten, vooral wanneer deze laag of marginaal zijn.

Gegevens aangaande de toxiciteit van de stof ten opzichte van micro-organismen zijn gewenst voor de interpretatie van lage resultaten en voor de keuze van de geschikte testconcentraties.

1.2. Definities en eenheden

De aan het eind van de proef verkregen mate van afbraak wordt opgegeven als de „biologische afbreekbaarheid in de Zahn-Wellens test":

$$D_T\,(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

waarin

D_T = biologische afbraak (%) op tijd T,

C_A = DOC- of COD-waarden in het testmengsel, zoals gemeten drie uur na het begin van de test (mg/l) (DOC = opgeloste organische koolstof, COD = chemisch zuurstofverbruik),

C_T = DOC- of COD-waarden in het testmengsel op het tijdstip van monsterneming (mg/l),

C_B = DOC- of COD-waarden van de blanco op het tijdstip van monsterneming (mg/l),

C_{BA} = DOC- of COD-waarden van de blanco, zoals gemeten drie uur na het begin van de test (mg/l).

De mate van afbraak wordt op het dichtstbijzijnde hele procent afgerond.

Het percentage afbraak wordt bepaald als zijnde het percentage DOC- of COD-verwijdering van de onderzochte stof.

Het verschil tussen de waarde gemeten na drie uur en de berekende of bij voorkeur gemeten oorspronkelijke waarde kan nuttige informatie verschaffen over de verwijdering van de stof (zie 3.2: Interpretatie van de resultaten).

1.3. **Referentiestoffen**

Bij het onderzoeken van nieuwe stoffen kunnen referentiestoffen soms van nut zijn; er kunnen echter nog geen specifieke referentiestoffen worden aanbevolen.

1.4. **Principe van de testmethode**

In een glazen vat van 1 tot 4 liter inhoud, uitgerust met een roertoestel en een beluchtingsapparaat, worden actief slib, minerale voedingsstoffen en het testmateriaal als enige koolstofbron in water bij elkaar gebracht. Het mengsel wordt gedurende hooguit 28 dagen onder diffuus licht of in een donkere ruimte bij 20 tot 25 °C geroerd en belucht. Het verloop van het afbraakproces wordt gevolgd door het dagelijks of op andere geschikte gezette tijden bepalen van de DOC- of COD-waarden in de gefiltreerde oplossing. De verhouding tussen de verdwenen hoeveelheid DOC (of COD) bij elke meettijd en de hoeveelheid drie uur na het begin wordt uitgedrukt als het percentage biologische afbraak en dient voor het bepalen van de mate van afbraak op dat tijdstip.

Het resultaat wordt uitgezet tegen de tijd en geeft aldus de kromme van de biologische afbraak.

Wanneer een specifieke analytische methode wordt toegepast, kunnen de veranderingen in de concentratie van de uitgangsmolecule als gevolg van de biologische afbraak worden gemeten (primaire biologische afbreekbaarheid).

1.5. **Kwaliteitscriteria**

De reproduceerbaarheid van deze test is in een ringtest voldoende gebleken. De gevoeligheid van de methode wordt grotendeels bepaald door de veranderlijkheid van de blanco en, in mindere mate, door de nauwkeurigheid van de bepaling van opgeloste organische koolstof en van de concentratie van de testverbinding in de vloeistof.

1.6. **Beschrijving van de testmethode**

1.6.1. *Preparaten*

1.6.1.1. Reagentia

Water: drinkwater met een organisch-koolstofgehalte kleiner dan 5 mg/l. De totale concentratie van calcium- en magnesiumionen te zamen mag 2,7 mmol/l niet overschrijden; zonodig moet met gedeïoniseerd of gedestilleerd water worden verdund.

Zwavelzuur, analytisch reagens (AR):	50 g/l.
Natriumhydroxideoplossing AR:	40 g/l.
Minerale nutriëntoplossingen: hiervoor wordt in 1 liter gedeïoniseerd water opgelost:	
ammoniumchloride, NH_4Cl, AR:	38,5 g,
natriumdiwaterstoffosfaat, $NaH_2PO_4 . 2 H_2O$, AR:	33,4 g,
kaliumdiwaterstoffosfaat, KH_2PO_4, AR:	8,5 g,
di-kaliumwaterstoffosfaat, K_2HPO_4, AR:	21,75 g.

Dit mengsel dient tegelijkertijd als voedingsstof maar ook als bufferoplossing.

1.6.1.2. Apparatuur

Glazen vaten met inhoud van 1 tot 4 liter (bij voorbeeld cilindervormige recipiënten).

Roerapparaat met glazen of metalen roerblad op een geschikte schacht. (De roerder moet 5 tot 10 cm boven de bodem van het vat ronddraaien.) Een magneetroerder met een roerstaaf van 7 tot 10 cm kan eveneens gebruikt worden.

Glazen buis met een inwendige diameter van 2 tot 4 mm voor het inleiden van lucht. De opening van de buis moet zich ongeveer 1 cm boven de bodem van het vat bevinden.

Centrifuge (ongeveer 3 550 g).

pH-meter.

Apparaat voor het meten van de opgeloste zuurstof.

Papieren filters.

Membraanfiltreerapparaat.

Membraanfilters, mazen van 0,45 µm. Membraanfilters zijn geschikt als vaststaat dat zij geen koolstof afgeven en bij het filtreren de stof niet absorberen.

Analyseapparatuur voor het bepalen van het organisch koolstofgehalte en het chemisch zuurstofverbruik.

1.6.1.3. Bereiding van het inoculum

Actief slib uit een biologische zuiveringsinstallatie wordt gewassen door (herhaald) centrifugeren of bezinken in het water dat gebruikt wordt voor de test (zie boven).

Het actief slib moet de juiste kenmerken hebben. Dergelijk slib kan worden betrokken van een goed werkende waterzuiveringsinstallatie. Om zoveel mogelijk verschillende soorten en stammen van bacteriën te verkrijgen kan het de voorkeur verdienen inocula van verschillende bronnen (bij voorbeeld verschillende zuiveringsinstallaties, bodemextracten, rivierwater en dergelijke) te mengen. Het mengsel moet dan worden behandeld als hierboven beschreven.

Voor het controleren van de activiteit van het actief slib, zie 1.6.2, onder „Functionele controle".

1.6.1.4. Bereiding van de testoplossingen

In het testvat worden gebracht: 500 ml testwater, 2,5 ml/l minerale nutriëntoplossing en een hoeveelheid actief slib die overeenkomt met 0,2—1,0 g/l droge stof in het uiteindelijke mengsel. Hieraan wordt een voldoende hoeveelheid van een voorraadoplossing van de te onderzoeken stof toegevoegd, zodanig dat het DOC-gehalte in het uiteindelijke mengsel 50—400 mg/l bedraagt. De overeenkomstige COD-waarden zijn 100—1 000 mg/l. Het volume wordt met testwater op een totaal van 1 tot 4 liter gebracht. De keuze van het volume wordt bepaald door het aantal monsters voor de DOC- of COD-bepaling en door de voor de analytische procedure benodigde volumes.

Doorgaans wordt een volume van 2 liter als voldoende beschouwd.

Er wordt ten minste één blanco controlevat bereid dat parallel met elke testreeks wordt behandeld; het bevat alleen actief slib en minerale nutriëntoplossing, aangevuld met testwater tot hetzelfde totale volume als in de testvaten.

1.6.2. *Uitvoering van de test*

De testvaten worden geroerd met magneetroerders of schroefbladen onder gedempt licht of in het donker bij 20 tot 25 °C. Beluchting vindt plaats door middel van perslucht die met een wattenfilter en eventueel een wasfles wordt gereinigd. Er dient voor gezorgd te worden dat het slib niet bezinkt en de zuurstofconcentratie niet beneden de 2 mg/l daalt.

De pH-waarde wordt op gezette tijden (bij voorbeeld dagelijks) gemeten en zonodig bijgesteld tot pH 7 à 8.

Verliezen ten gevolge van verdamping worden vlak voor de monsterneming aangevuld met gedeïoniseerd of gedestilleerd water in de vereiste hoeveelheden. Een goede methode bestaat erin, het vloeistofniveau voor het begin van de proef aan te duiden op het vat. Na elke monsterneming worden, bij uitgeschakelde beluchting en beroering, nieuwe aanduidingen aangebracht.

De eerste monsters worden steeds drie uur na het begin van de test genomen, ten einde adsorptie van testmateriaal aan het actief slib te kunnen ontdekken.

De verwijdering van het testmateriaal wordt gevolgd aan de hand van DOC- of COD-bepalingen, welke dagelijks of op andere gezette tijden worden uitgevoerd. De monsters uit het testvat en de blanco's worden gefiltreerd door een zorgvuldig gewassen papieren filter. De eerste 5 ml filtraat van de testoplossing worden niet gebruikt. Moeilijk filtreerbaar slib kan worden afgescheiden door voorafgaand centrifugeren gedurende tien minuten. DOC- en COD-bepalingen worden ten minste in duplo uitgevoerd. De test duurt maximaal 28 dagen.

Opmerking: Monsters die troebel blijven, worden gefiltreerd door membraanfilters. De membraanfilters mogen geen organisch materiaal afgeven of adsorberen.

Functionele controle van het actieve slib

Parallel met elke testreeks wordt een vat met een bekende stof onderzocht ten einde de functionele capaciteit van het actieve slib te controleren. Diëthyleenglycol is voor dit doel bruikbaar gebleken.

Adaptatie

Indien de analyses met betrekkelijk korte intervallen worden uitgevoerd (bij voorbeeld dagelijks), komt het adaptatiefenomeen duidelijk tot uiting in de afbraakkromme (zie figuur 2). Om deze reden wordt de test niet vlak voor het weekeinde gestart. Indien adaptatie in de laatste dagen van de test optreedt, kan de test worden verlengd tot de afbraak is beëindigd.

Opmerking: Indien een grondiger kennis van het gedrag van het geadapteerde slib nodig is, wordt hetzelfde actief slib nogmaals met hetzelfde testmateriaal in contact gebracht volgens de volgende procedure:

De roermotor en het beluchtingsapparaat worden uitgeschakeld en men laat het actief slib bezinken. De bovendrijvende vloeistof wordt verwijderd, het volume wordt met water op 2 liter gebracht, vervolgens wordt er vijftien minuten geroerd, waarna men het slib weer laat bezinken. Nadat de bovendrijvende vloeistof weer is verwijderd, wordt het resterende slib gebruikt om de test met hetzelfde materiaal volgens 1.6.1.4 en 1.6.2 te herhalen.

Het actief slib kan ook door centrifugeren in plaats van door bezinken worden afgezonderd.

Het geadapteerde slib kan met vers slib worden gemengd tot een totale hoeveelheid van 0,2—1 g droog gewicht per liter.

Analyse

Doorgaans worden de monsters gefiltreerd door een grondig gewassen papieren filter (voor het wassen wordt gedeïoniseerd water gebruikt).

Monsters die troebel blijven, worden door membraanfilters gefiltreerd (0,45 µm).

De DOC-concentratie in de filtraten van het monster (eerste 5 ml worden niet gebruikt) wordt, in duplo, bepaald met behulp van het DOC-instrument. Als analyse van de filtraten op dezelfde dag niet mogelijk is, worden deze tot de volgende dag in de koelkast bewaard. Langer bewaren wordt niet aanbevolen.

De COD-concentratie in de filtraten van het monster wordt bepaald met een COD-analyseapparaat volgens de procedure beschreven in referentie (2).

2. RESULTATEN

De DOC- en COD-concentraties in de monsters worden ten minste in duplo bepaald volgens 1.6.2. Het percentage afbraak op tijdstip T wordt berekend volgens de bij 1.2 gegeven formule (met definities).

De mate van afbraak wordt naar het dichtstbijzijnde geheel percent afgerond. De mate van afbraak die aan het eind van de test is verkregen, wordt opgegeven als de „biologische afbreekbaarheid in de Zahn-Wellens test".

Opmerking: Indien volledige afbraak bereikt wordt voor het einde van de testduur en dit resultaat door een tweede analyse op de volgende dag wordt bevestigd, kan de test worden beëindigd.

3. VERSLAG

3.1. Testverslag

Het testrapport moet, indien mogelijk, bevatten:

— de beginconcentratie van de teststof,

— alle andere gegevens en experimentele resultaten betreffende de onderzochte stof, de referentiestof, indien gebruikt, en de blanco,

— de concentratie na drie uur,

— de biologische afbraakkromme met een toelichting,

— datum en plaats van monsterneming van het inoculum, adaptatietoestand, gebruikte concentratie, enz.,

— wetenschappelijke verantwoording voor eventuele wijzigingen in de testprocedure.

3.2. Interpretatie van de resultaten

Geleidelijke verwijdering van DOC of COD in de loop van dagen of weken betekent dat de teststof biologisch wordt afgebroken.

Fysisch-chemische adsorptie kan echter in sommige gevallen een rol spelen en dit wordt aangetoond door een gehele of gedeeltelijke verwijdering van de teststof gedurende de eerste drie uur en door het onverwacht klein blijven van het verschil tussen de resultaten bekomen met de controlevloeistof en de bovendrijvende vloeistof.

Als er onderscheid moet worden gemaakt tussen de biologische afbraak (of gedeeltelijke biologische afbraak) en adsorptie, zijn aanvullende proeven nodig.

Dit kan op een aantal manieren geschieden, waarvan de meest geschikte erin bestaat de bovendrijvende vloeistof als inoculum te gebruiken in een test van het basisniveau (bij voorkeur een respirometrische test).

Stoffen die in deze test een grote mate van niet door adsorptie veroorzaakte verwijdering van DOC (COD) te zien geven, dienen te worden beschouwd als potentieel biologisch afbreekbaar. Een gedeeltelijke, niet door adsorptie veroorzaakte verwijdering duidt erop dat de stof ten minste in enige mate biologisch afbreekbaar is.

Een geringe of ontbrekende verwijdering van DOC (COD) kan het gevolg zijn van remming van micro-organismen door de teststof en dit kan ook aan het licht komen door lysis en verlies van slib, hetgeen leidt tot troebele bovendrijvende vloeistoffen. In een dergelijk geval moet de test worden herhaald met een lagere concentratie van teststof.

Door toepassing van een voor een verbinding specifieke analytische methode of van een met ^{14}C gemerkte teststof kan een grotere gevoeligheid worden bereikt. Bij onderzoek van een ^{14}C-verbinding vormt het terugvinden van $^{14}CO_2$ de bevestiging dat biologische afbraak heeft plaatsgevonden.

Wanneer resultaten worden uitgedrukt in termen van primaire biologische afbraak dient er, zo mogelijk, een verklaring gegeven te worden over de wijziging van de chemische structuur die leidt tot een vermindering van de respons van de oorspronkelijke teststof.

De validatie van de analytische methode moet opgegeven worden te zamen met de respons die gevonden werd met het blanco-testmedium.

4. REFERENTIES

(1) OESO, Parijs, 1981, *Testrichtlijn 302 B,* Besluit C(81) 30 def. van de Raad.

(2) Bijlage V, C 9 Degradatie: Chemisch zuurstofverbruik, Richtlijn 84/449/EEG van de Commissie, *Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen* nr. L 25 van 19. 9. 1984.

Aanhangsel

VOORBEELD VAN EEN VERSLAG

Organische verbinding: 4-Ethoxybenzoëzuur
Theoretische testconcentratie: 600 mg/l
Theoretische DOC: 390 mg/l

Entmateriaal: Waterzuiveringsinstallatie van . . .
Concentratie: 1 g droge stof per liter
Adaptatietoestand: niet geadapteerd

Analyse: DOC-bepaling

Monstervolume: 3 ml

Controlestof: Diëthyleenglycol

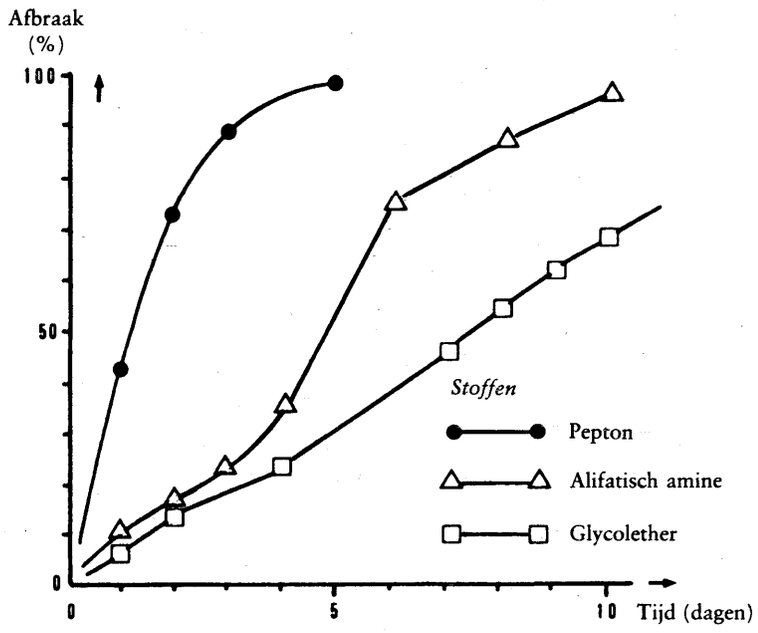
Toxiciteit van de verbinding: Geen toxische effecten beneden 1 000 mg/l
Gebruikte test: fermentatie/buizentest

Testtijd	Controlestof				Teststof		
	Blanco DOC (1) mg/l	DOC (1) mg/l	Netto DOC mg/l	Afbraak %	DOC (1) mg/l	Netto DOC mg/l	Afbraak %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 uur	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 dag	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dagen	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dagen	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dagen	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dagen	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dagen	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dagen	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dagen	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Gemiddelde waarden van bepalingen in triplo.

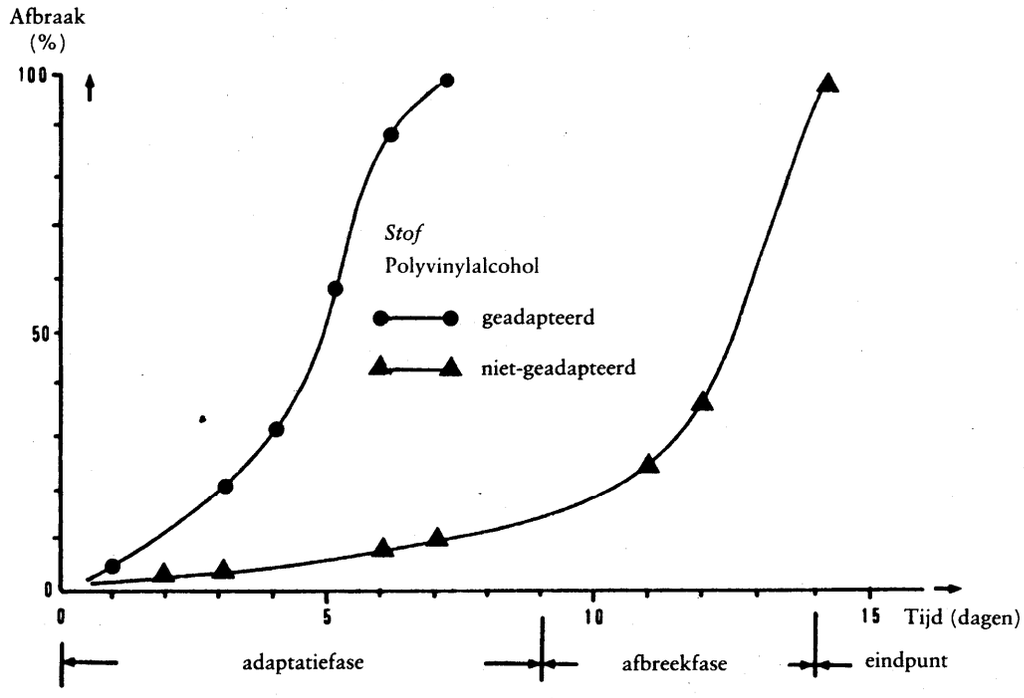
Figuur 1

Voorbeelden van krommen van de biologische afbraak



Figuur 2

Voorbeelden van adaptatie van slib



BIOLOGISCHE AFBRAAK

SIMULATIEPROEVEN ACTIEF SLIB

1. METHODE

1.1. Inleiding

1.1.1. *Algemene opmerkingen*

De methode is uitsluitend van toepassing op die organische stoffen die bij de in de test gebruikte concentratie:

— oplosbaar zijn in water in de mate die nodig is voor de bereiding van de testoplossingen,

— onder de testomstandigheden een te verwaarlozen dampdruk hebben,

— niet remmend werken op bacteriën.

Gegevens over de mate waarin de belangrijke componenten van het testmateriaal zich tot elkaar verhouden, zijn van nut bij de interpretatie van de verkregen resultaten, vooral wanneer de testwaarden laag of marginaal zijn.

Informatie over de giftigheid van de stof voor micro-organismen is gewenst voor de interpretatie van lage testwaarden en bij de keuze van de juiste testconcentraties.

1.1.2. *Bepaling van de uiteindelijke biologische afbreekbaarheid (DOC/COD-analyse)*

Het doel van deze methode is de uiteindelijke biologische afbreekbaarheid te bepalen door het meten van de afbraaksnelheid van de stof en eventuele metabolieten daarvan in een actief-slibmodelinstallatie bij een concentratie die overeenkomt met meer dan 12 mg DOC/l (of ongeveer 40 mg COD/l). De ideale concentratie ligt rond 20 mg DOC/l.

(DOC = opgeloste organische koolstof; COD = CZV = chemisch zuurstofverbruik.)

Het organisch koolstofgehalte (of het chemisch zuurstofverbruik) van het testmateriaal moet bepaald worden.

1.1.3. *Bepaling van de primaire biologische afbreekbaarheid (specifieke analyse)*

Het doel van deze methode is de primaire biologische afbreekbaarheid van een stof te bepalen in een actief-slibmodelinstallatie bij een concentratie van ongeveer 20 mg/l volgens een bepaalde analytische methode (een hogere of een lagere concentratie is mogelijk indien de analytische methode en de eventuele toxiciteit dat toelaten). Hiermee kan de primaire biologische afbreekbaarheid van de stof (verdwijning van de oorspronkelijke chemische structuur) worden bepaald.

Doel van deze methode is *niet* het bepalen van de mineralisatie van de onderzochte stof.

Voor de bepaling van de onderzochte stof moet een goede analytische methode beschikbaar zijn.

1.2. Definitities en eenheden

1.2.1. *DOC/COD-analyse*

De mate van verdwijning van de stof wordt gegeven door:

$$DR = \frac{T - (E - E_O)}{T} \times 100\% \qquad [1\ a)]$$

waarin:

DR = mate van verdwijning in procent DOC (of COD) binnen de gegeven gemiddelde verblijftijd ten opzichte van het testmateriaal,

T = concentratie van het testmateriaal in de toevoerstroom in mg DOC/l (of COD/l),

E = DOC- of COD-concentratie in de afvoerstroom (effluent) van de testeenheid in mg DOC/l (of COD/l),

E_O = DOC- of COD-concentratie in de afvoerstroom van de blanco-eenheid in mg DOC/l (of COD/l).

De afbraak wordt opgegeven als percentage DOC- of COD-verwijdering binnen de gegeven verblijftijd ten opzichte van het testmateriaal.

1.2.2. *Specifieke analyse*

Het percentage verdwijning van de onderzochte stof uit de waterfase (R_W) binnen de gegeven verblijftijd wordt gegeven door:

$$R_W = \frac{C_I - C_O}{C_I} \times 100\% \qquad [1\,b)]$$

waarin:

C_I = concentratie van de stof in de toevoerstroom van de testeenheid (mg stof/l, bepaald met specifieke analyse),

C_O = concentratie van de stof in de afvoerstroom van de testeenheid (mg stof/l, bepaald met specifieke analyse).

1.3. **Referentiestoffen**

Bij het onderzoek van een nieuwe stof kan het gebruik van referentiestoffen in sommige gevallen nuttig zijn; speciefieke referentiestoffen kunnen echter nog niet worden aanbevolen.

1.4. **Principe van de testmethoden**

Voor de bepaling van de uiteindelijke biologische afbreekbaarheid worden twee proefeenheden met actief slib (van OESO-bevestigende test of poreuze potten) tegelijkertijd in werking gesteld. De teststof wordt aan het influent (kunstmatig of huishoudelijk afvalwater) van een van de twee eenheden toegevoegd terwijl de andere alleen afvalwater ontvangt. Voor de bepaling van de primaire biologische afbreekbaarheid met specifieke analyse van het influent en effluent wordt slechts één eenheid gebruikt.

De DOC- of COD-concentraties van het effluent worden gemeten; ook kunnen de concentraties van de stof zelf en afbreekprodukten bepaald worden met specifieke analysemethoden.

De DOC van de uitgangsstof wordt niet gemeten maar eenvoudig opgegeven.

Wanneer DOC- of COD-metingen worden verricht, wordt verondersteld dat het verschil in gemiddelde concentraties tussen de effluenten van de test en van de controle het gevolg is van niet-afgebroken uitgangsstof.

Wanneer specifieke analyses worden uitgevoerd, kan de verandering in de concentratie van de oorspronkelijke verbinding worden gemeten (primaire biologische afbreekbaarheid).

De eenheden kunnen eventueel werken volgens de „coupled units mode" via wederzijdse enting.

1.5. **Kwaliteitsnormen**

De aanvangsconcentratie van de stof is afhankelijk van het type toegepaste analyse en de beperkingen daarvan.

1.6. **Beschrijving van de methode**

1.6.1. *Voorbereiding*

1.6.1.1. Apparatuur

Er zijn twee eenheden van hetzelfde type nodig, behalve wanneer specifieke analyses worden verricht. Twee soorten installaties kunnen worden gebruikt:

OESO-bevestigende test

De apparatuur (aanhangsel 1) bestaat uit een voorraadvat (A) voor kunstmatig afvalwater, een doseerpomp (B), een beluchtingsvat (C), een nabezinkvat (D), een persluchtpomp (E) voor het recirculeren van actief slib en een vergaarbak (F) voor het opvangen van behandeld afvalwater.

De vaten (A) en (F) zijn van glas of geschikte kunststof met een inhoud van ten minste 24 liter. Pomp (B) zorgt voor een constante toevoer van kunstmatig afvalwater naar het beluchtingsvat; elk geschikt systeem mag worden gebruikt, mits de toevoerstroom en de concentratie worden gehandhaafd.

Bij normaal gebruik is de hoogte van het nabezinkvat (D) zo ingesteld dat het beluchtingsvat 3 liter gemengde vloeistof bevat. Een plaatje van gesinterd glas voor de beluchting (beluchter) (G) hangt in vat (C) op het laagste

punt van de binnenste kegel van dit vat. De hoeveelheid via de beluchtingsinrichting ingeblazen lucht wordt gemeten met een stroommeter.

De persluchtpomp (E) wordt zo ingesteld dat het actief slib voortdurend en gelijkmatig uit het nabezinkvat naar beluchtingsvat (C) wordt teruggevoerd.

„Poreuze pot"

De „poreuze pot" wordt vervaardigd van vellen poreus polyethyleen (2 mm dik, maximale poriegrootte 95 µm), waarvan cilinders van 14 cm doorsnede worden gemaakt met een conisch uiteinde van 45° (figuren 1 en 2 van aanhangsel 2). De poreuze pot is ingesloten in een ondoordringbaar vat van geschikte kunststof van 15 cm doorsnede met een uitgang op 17,2 cm hoogte op het cilindrische gedeelte, die het volume (3 liter) in de pot bepaalt. Een vaste draagring van geschikte kunststof rondom de bovenkant van het binnenvat zorgt ervoor dat er tussen het binnenvat en het buitenvat een ruimte is van 0,5 cm breedte voor het afvalwater.

De poreuze potten kunnen worden opgehangen in het midden van een thermostatisch geregeld waterbad. Er is luchttoevoer naar de bodem van het binnenvat waarop geschikte beluchters zijn gemonteerd.

De vaten (A) en (E) zijn van glas of geschikte kunststof met een inhoud van ten minste 24 liter. Pomp (B) zorgt voor een constante toevoer van kunstmatig rioolwater naar het beluchtingsvat; elk geschikt systeem is bruikbaar, mits de invoerstroom en de concentratie zijn verzekerd.

Er moeten enige poreuze binnenpotten in reserve worden gehouden ter vervanging van potten die tijdens het gebruik verstopt raken; verstopte potten worden gereinigd door ze 24 uur in een hypochlorietoplossing te dompelen en vervolgens grondig met leidingwater te spoelen.

1.6.1.2. Filtratie

De membraanfiltratieapparatuur en membraanfilters hebben een poriegrootte van 0,45 µm. Membraanfilters zijn geschikt indien vaststaat dat zij geen koolstof afgeven en de stof tijdens de filtratie niet absorberen.

1.6.1.3. Afvalwater

Er kan gebruik gemaakt worden van geschikt kunstmatig afvalwater of van huishoudelijk afvalwater.

Voorbeeld van een kunstmatige toevoer

Per liter leidingwater worden opgelost:

Pepton:	160 mg,
Vleesextract:	110 mg,
Ureum:	30 mg,
NaCl:	7 mg,
$CaCl_2 . 2H_2O$:	4 mg,
$MgSo_4 . 7H_2O$:	2 mg,
K_2HPO_4:	28 mg.

Huishoudelijk afvalwater

Dit wordt dagelijks opnieuw verzameld uit de overloop van de primaire bezinkingsvijver van een zuiveringsinstallatie voor voornamelijk huishoudelijk afvalwater.

1.6.1.4. Voorraadoplossing testmateriaal

Een oplossing van de teststof (bij voorbeeld 1 %) wordt bereid, ten einde aan de testeenheid te worden toegevoegd. De concentratie van het materiaal wordt bepaald, zodat het juiste volume bekend is dat aan het afvalwater of rechtstreeks aan de eenheid via een tweede pomp moet worden toegevoegd, ten einde de vereiste testconcentratie te verkrijgen.

1.6.1.5. Entmateriaal

Opmerking: Bij gebruik van huishoudelijk afvalwater heeft het geen zin entmateriaal met lage bacterieconcentratie te gebruiken; actief slib kan echter wel worden gebruikt.

Verschillende entmaterialen kunnen worden gebruikt.

Drie voorbeelden:

a) Entmateriaal uit secondaire effluent

Het entmateriaal wordt genomen van een secondaire effluent van goede kwaliteit uit een zuiveringsinstallatie voor voornamelijk huishoudelijk afvalwater. Het monster afvoerwater wordt tussen de bemonstering en het gebruik onder aerobe omstandigheden gehouden. Voor de bereiding van het entmateriaal wordt het monster door een grof filter geleid, waarbij de eerste 200 ml wordt weggeworpen. Het filtraat wordt tot aan het gebruik aeroob gehouden. Het entmateriaal moet op de dag van de monstername worden gebruikt. Voor het enten is ten minste 3 ml nodig.

b) Samengesteld entmateriaal

Entmateriaal uit secondaire effluent

Zie beschrijving hierboven.

Entmateriaal uit bodem

100 g tuingrond (vruchtbaar, niet steriel) wordt gesuspendeerd in 1 000 ml chloorvrij drinkwater. (Grond met een extreem gehalte aan klei, zand of humus is niet geschikt.) Na roeren laat men de suspensie 30 minuten bezinken. De bovenstaande vloeistof wordt door een grof papierfilter gehaald, waarbij de eerste 200 ml wordt weggeworpen. Het filtraat wordt direct daarna tot aan het gebruik belucht. Het entmateriaal wordt op de dag van bereiding gebruikt.

Entmateriaal uit oppervlaktewater

Ook wordt nog een deel van het entmateriaal genomen uit mesosaproob oppervlaktewater. Het monster wordt door een grof papierfilter geleid, waarbij de eerste 200 ml wordt weggeworpen. Het filtraat wordt aeroob gehouden tot aan het gebruik. Het entmateriaal wordt gebruikt op de dag van de monstername.

Gelijke volumes van de drie verschillende entmonsters worden bijeengebracht en grondig gemengd. Het uiteindelijke entmateriaal wordt van dit mengsel genomen. Voor het enten wordt ten minste 3 ml gebruikt.

c) Entmateriaal uit actief slib

Als entmateriaal kan ook een hoeveelheid (niet meer dan 3 liter) actief slib (gehalte aan gesuspendeerde vaste stof maximaal 2,5 g/l) worden genomen uit de beluchtingstank van een zuiveringsinstallatie voor voornamelijk huishoudelijk afvalwater.

1.6.2. *Werkwijze*

De test wordt uitgevoerd bij kamertemperatuur, dat wil zeggen tussen 18 en 25°C.

Indien gewenst kan de test ook bij lagere temperatuur (minimaal 10 °C) worden uitgevoerd; indien de stof dan wordt afgebroken, is verder onderzoek doorgaans niet nodig. Indien de stof bij die temperatuur echter niet wordt afgebroken, moet de test worden uitgevoerd bij een constante temperatuur tussen 18 en 25 °C.

1.6.2.1. Aanloopperiode: vorming en stabilisatie van slib in de eenheden

De groei/stabilisatieperiode van het slib is de tijd gedurende welke de concentratie gesuspendeerd actief slib en de activiteit van de testeenheden toenemen tot een stationaire toestand bereikt wordt onder de heersende omstandigheden.

De aanloopperiode is de periode tussen het tijdstip waarop de toevoeging van teststof begint en het tijdstip waarop de verwijdering daarvan een plateau (betrekkelijk constante waarde) bereikt. Deze periode dient niet langer dan zes weken te zijn.

De beoordelingsperiode is een tijdvak van drie weken vanaf het tijdstip dat de verwijdering van de teststof een betrekkelijk constante, doorgaans hoge waarde bereikt. Voor stoffen die in de eerste zes weken weinig of geen afbraak vertonen, worden de daaropvolgende drie weken genomen als beoorderlingsperiode.

Als eerste stap worden de voor één test benodigde eenheden gevuld met het toevoerwater gemengde entmateriaal.

De beluchter (en persluchtpomp (E) bij gebruik van de eenheden van de OESO-bevestigende test) en doseerinrichting (B) worden vervolgens in werking gesteld.

Door het beluchtingsvat (C) wordt toevoerwater zonder teststof geleid met een snelheid van hetzij 1 liter per uur hetzij 0,5 liter per uur; dit geeft een gemiddelde verblijftijd van drie respectievelijk zes uur.

De beluchting wordt zodanig geregeld dat de inhoud van het vat (C) constant in suspensie blijft en het gehalte opgeloste zuurstof ten minste 2 mg/l bedraagt.

Schuimvorming wordt met gepaste middelen tegengegaan. Anti-schuimmiddelen die het actief slib remmen, mogen niet worden gebruikt.

Het slib, dat zich langs de bovenste rand van het beluchtingsvat (C) en (bij testeenheden van de OESO-bevestigende test) onder in het nabezinkvat (D) en in de omloop heeft verzameld, wordt ten minste eenmaal per dag door roeren of op andere wijze naar de gemengde suspensie teruggebracht.

Wanneer het slib niet bezinkt, kan de dichtheid ervan worden verhoogd door 2 ml 5 % ijzer(III)-chlorideoplossing toe te voegen en dit zo nodig te herhalen.

Het effluent wordt gedurende 20 tot 24 uur in vat (E respectievelijk F) opgevangen en na grondig mengen wordt er een monster genomen. Vat E of F wordt daarna grondig gereinigd.

Om de efficiëntie van het proces te volgen en zo nodig bij te sturen, worden het chemisch zuurstofverbruik of het gehalte opgeloste organische koolstof (DOC) van het filtraat van het opgevangen effluent en dat van het gefiltreerde influent ten minste tweemaal per week gemeten (filtratie geschiedt met een membraan met een poriegrootte van 0,45 µm waarbij het eerste filtraat van ongeveer 20 ml wordt weggeworpen).

De afname van COD of DOC moet zich stabiliseren wanneer een min of meer regelmatige dagelijkse afbraak is bereikt.

Het gehalte aan droge stof van het actief slib in het beluchtingsvat wordt ten minste tweemaal per week bepaald (in g/l). De eenheden kunnen op twee manieren in werking worden gehouden: in het ene geval wordt het gehalte droge stof in het actief slib tweemaal per week bepaald en, wanneer dit boven 2,5 g/l komt, wordt de overmaat actief slib afgevoerd; in het andere geval wordt dagelijks 500 ml van de gemengde vloeistof afgevoerd, zodat een gemiddelde verblijftijd voor het slib van zes dagen ontstaat.

Wanneer de gemeten en geschatte parameters (efficiëntie van het proces (in COD- of DOC-verwijdering), slibconcentratie, bezinkingsneiging van het slib, troebelheid van het effluent en dergelijke) van de twee eenheden voldoende constant zijn geworden, kan de teststof in de toevoerstroom van een van de twee eenheden, overeenkomstig 1.6.2.2, worden toegevoegd.

Als alternatief kan de teststof worden toegevoegd bij het begin van de slibgroeiperiode (1.6.2.1), in het bijzonder wanneer slib als entmateriaal wordt toegevoegd.

1.6.2.2. Testprocedure

De bedrijfscondities van de aanloopperiode worden gehandhaafd en er wordt voldoende voorraadoplossing (ongeveer 1 %) van de teststof aan de toevoer van de testeenheid toegevoegd zodat de gewenste concentratie teststof (ongeveer 10—20 mg DOC/l of 40 mg COD/l) in het afvalwater wordt verkregen. Dit kan worden bereikt door de oplossing dagelijks in het afvalwater te mengen of door een afzonderlijk pompsysteem. Deze concentratie kan geleidelijk worden bereikt. Indien de teststof geen vergiftiging van het actief slib teweeg brengt, kunnen ook hogere concentraties worden onderzocht.

De blanco-eenheid wordt uitsluitend met toevoerwater gevoed zonder toegevoegde stoffen. Voor analyse worden geschikte volumes effluent genomen en door membraanfilters (0,45 µm) geleid, waarbij het eerste filtraat van ongeveer 20 ml wordt weggeworpen.

De gefiltreerde monsters moeten op dezelfde dag worden geanalyseerd of anders op een geschikte wijze worden geconserveerd, bij voorbeeld door aan elke tien ml filtraat 0,05 ml 1 % kwik(II)chlorideoplossing toe te voegen of door gekoeld (2—4 °C tot 24 uur, – 18 °C indien langer) te bewaren.

De aanlooptijd waarin de teststof wordt toegevoegd dient niet langer te zijn dan zes weken en de beoordelingsperiode niet korter dan drie weken, zodat ongeveer 14 tot 20 bepalingen beschikbaar zijn voor de berekening van het eindresultaat.

Gekoppelde eenheden

De koppeling van de eenheden komt tot stand door eenmaal per dag 1,5 liter actief-slibsuspensie uit de beluchtingsvaten met actief slib tussen de twee eenheden uit te wisselen. Indien het testmateriaal sterk absorberend is, wordt slechts 1,5 liter van de bovenstaande vloeistof uit de bezinkingsvaten opgenomen en in het actief-slibvat van de andere eenheid gegoten.

1.6.2.3. Analyse

Om het gedrag van de stof te volgen, kunnen twee soorten analyse worden uitgevoerd:

DOC en COD

De DOC-concentraties worden in duplo bepaald met de koolstofanalysator en/of de COD-waarden worden bepaald overeenkomstig referentie (2).

Specifieke analyse

De concentraties van de onderzochte stoffen worden bepaald met een geschikte analytische methode. Zo mogelijk wordt ook een specifieke bepaling van de stof geabsorbeerd op slib uitgevoerd.

2. GEGEVENS

2.1. Gekoppelde eenheden

Wanneer de methode van gekoppelde eenheden wordt gevolgd, worden de dagelijkse verdwijningspercentages berekend volgens 1.2.1.

Deze dagelijkse verdwijningspercentages worden gecorrigeerd tot DRc voor de materiaaloverdracht als gevolg van de overentingsprocedure met behulp van vergelijking [2] voor een verblijftijd van drie uur en vergelijking [3] voor een verblijftijd van zes uur:

$$DRc = \frac{8}{7} DR - \frac{100}{7} \qquad [2]$$

$$DRc = \frac{4}{3} DR - \frac{100}{3} \qquad [3]$$

Het gemiddelde van de DRc-waarden wordt, evenals de standaardafwijking, berekend met vergelijking [4]:

$$S_{DRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\overline{DRc} - DRc_i)^2}{n - 1}} \qquad [4]$$

waarin:

S_{DRc} = standaardafwijking van de reeks DRc-waarden,

$\overline{DRc}$ = gemiddelde DRc-waarde,

n = aantal bepalingen.

Uitschieters van de DRc-reeks worden geëlimineerd vanaf het 95 % waarschijnlijkheidsniveau volgens een geschikte statistische methode, bij voorbeeld Nalimov (6). Vervolgens worden het gemiddelde en de standaardafwijking van de DRc-waarden zonder uitschieters opnieuw berekend.

Het eindresultaat wordt vervolgens berekend met verglijking [5]:

$$DRc = \overline{DRc} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} S_{DRc} \qquad [5]$$

waarin:

$t_{n-1;\alpha}$ = tabelwaarde van t voor n paar waarden van E en E_O en statistische betrouwbaarheid P ($P = 1 - \alpha$), waarbij P wordt gesteld op 95 % (1).

Het resultaat wordt opgegeven als gemiddelde met tolerantiegrenzen bij het 95 % waarschijnlijkheidsniveau met opgave van de bijbehorende standaardafwijking en het aantal gegevens uit de DRc-reeks zonder uitschieters en het aantal uitschieters, bij voorbeeld:

DRc = 98,6 ± 2,3 % DOC-verwijdering,

s = 4,65 % DOC-verwijdering,

n = 18,

x = aantal uitschieters.

2.2. **Niet-gekoppelde eenheden**

De werking van de eenheden kan als volgt worden gecontroleerd:

$$\% \text{ verwijdering COD of DOC} = \frac{\text{COD of DOC toegevoerd afvalwater} - \text{COD of DOC effluent}}{\text{COD of DOC toegevoerd afvalwater}} \times 100$$

Deze dagelijkse verwijderingsgraad kan grafisch worden uitgezet, waardoor bepaalde tendensen, bij voorbeeld in verband met de acclimatisering, naar voren komen.

2.2.1. *Gebruik van COD/DOC-bepalingen*

Het dagelijkse verdwijningspercentage DR wordt berekend volgens 1.2.1.

Het gemiddelde van de DR-waarden en de standaardafwijking worden berekend overeenkomstig:

$$S_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\overline{DR} - DR_i)^2}{n - 1}} \qquad [6]$$

waarin:

S_{DR} = standaardafwijking van de reeks DR_i-waarden,

$\overline{DR}$ = gemiddelde van DR_i,

n = aantal bepalingen.

Uitschieters van de reeks DR-waarden worden geëlimineerd vanaf het 95 % waarschijnlijkheidsniveau volgens een geschikte statistische methode, bij voorbeeld Nalimov (6). Vervolgens worden het gemiddelde en de standaardafwijking van de DR-waarden zonder uitschieters opnieuw berekend.

Daarna wordt het eindresultaat berekend met vergelijking [7]

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} S_{DR} \qquad [7]$$

waarin:

$t_{n-1;\alpha}$ = tabelwaarde van t voor n paar waarden van E en E_O en statistische betrouwbaarheid P ($P = 1 - \alpha$), waarbij P wordt gesteld op 95 % (1).

Het resultaat wordt opgegeven als het gemiddelde met tolerantiegrenzen bij 95 % waarschijnlijkheidsniveau, de bijbehorende standaardafwijking en het aantal gegevens van de reeks DR-waarden zonder uitschieters en het aantal uitschieters, bij voorbeeld:

DR = (98,6 ± 2,3 %) DOC-verwijdering,

s = 4,65 % DOC-verwijdering,

n = 18,

x = aantal uitschieters.

2.2.2. *Gebruik van specifieke analyse*

Het percentage verwijdering van de teststof uit de waterfase (R_w) wordt berekend volgens 1.2.2.

3. VERSLAGGEVING

3.1. Testrapport

Het testrapport moet, indien mogelijk, bevatten:

— het in aanhangsel 3 weergegeven formulier waaruit de bedrijfsomstandigheden voor de test blijken;

— de gekozen apparatuur (OESO-bevestigende test of poreuze pot);

— de gekozen wijze van uitvoering: al dan niet gekoppelde eenheden;

— soort afvalwater: kunstmatig of huishoudelijk; indien huishoudelijk afvalwater, datum en plaats van bemonstering;

— entmateriaal, met datum en plaats van bemonstering;

— een verklaring met de beschrijving van de analysemethode indien specifieke analyses zijn uitgevoerd;

— grafiek van het percentage COD- of DOC-verwijdering als functie van de tijd, inclusief aanloopperiode en beoordelingsperiode;

— analytisch terugvindpercentage van de teststof als COD of DOC in de voorraadoplossing;

— indien specifieke analyses werden uitgevoerd, de grafiek van het percentage verwijdering van de onderzochte stof uit de waterfase als functie van de tijd (aanloop- en beoordelingsperiode);

— de gemiddelde verwijdering van DOC, COD of van teststof en standaardafwijking, berekend uit de resultaten van de beoordelingsperiode, dat wil zeggen wanneer er een constante verwijdering van testmateriaal is dan wel de installatie stationair werkt;

— grafiek van de concentratie actief slib als functie van de tijd;

— opmerkingen over het actief slib (verwijdering van overmaat slib, sterke toename, ijzerchloride, enz.)

— in de test gebruikte concentratie van de stof;

— alle resultaten van de analyse van het slib;

— alle informatie en experimentele resultaten over de teststof en, indien gebruikt, de referentiestof;

— wetenschappelijke verantwoording van eventuele wijzigingen in de procedure.

3.2. **Interpretatie van de resultaten**

Een geringe verwijdering van de teststof uit de waterfase kan het gevolg zijn van remming van micro-organismen door de teststof. Dit kan ook blijken uit de ontbinding en het verlies van slib, met als gevolg een troebele vloeistof en uit een afname van de efficiëntie van de COD- of DOC-verwijdering van de proefinstallatie.

Fysisch-chemische adsorptie kan ook een rol spelen. Verschillen tussen de biologische aantasting van de verbinding en de fysisch-chemische adsorptie kan blijken door analyse van het slib na een geschikte desorptie.

Indien onderscheid moet worden gemaakt tussen biologische afbraak (of gedeeltelijke biologische afbraak) en adsorptie, zijn verdere proeven nodig.

Hiervoor bestaat een aantal mogelijkheden, maar de meest ondubbelzinnige is het gebruik van de bovenstaande vloeistof als entmateriaal in een basistest (bij voorkeur respirometrische test).

Indien hoge percentages DOC- of COD-verwijdering worden waargenomen, is dit het gevolg van biologische afbraak, terwijl bij geringe verwijdering de biologische afbraak niet te onderscheiden is van verwijdering. Indien bij voorbeeld een oplosbare verbinding een hoge adsorptieconstante van 98 % blijkt te hebben en per dag 10 % overmaat slib wordt afgevoerd, is een verwijdering tot 40 % mogelijk; bij een afvoer van 30 % overmaat slib per dag kan verwijdering als gevolg van adsorptie aan en verwijdering met overmaat slib oplopen tot 65 % (4).

Wanneer specifieke analyses worden uitgevoerd, moet gelet worden op het verband tussen de structuur van de stof en de gebruikte specifieke analyse. In dit geval kan het waargenomen verschijnsel niet worden uitgelegd als mineralisering van de stof.

4. **REFERENTIES**

(1) OESO, Parijs, 1981, *Testrichtlijn 303 A,* Besluit C(81) 30 def. van de Raad.

(2) Bijlage V, C 9 Degradatie: Chemisch zuurstofverbruik, Richtlijn 84/449/EEG van de Commissie, *Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen* nr. L 251 van 19. 9. 1984.

(3) Painter, H. A., en King, E. F., Porous-Pot method for assessing biodegradability, *Technical Report TR70,* juni 1978, Water Research Centre, UK.

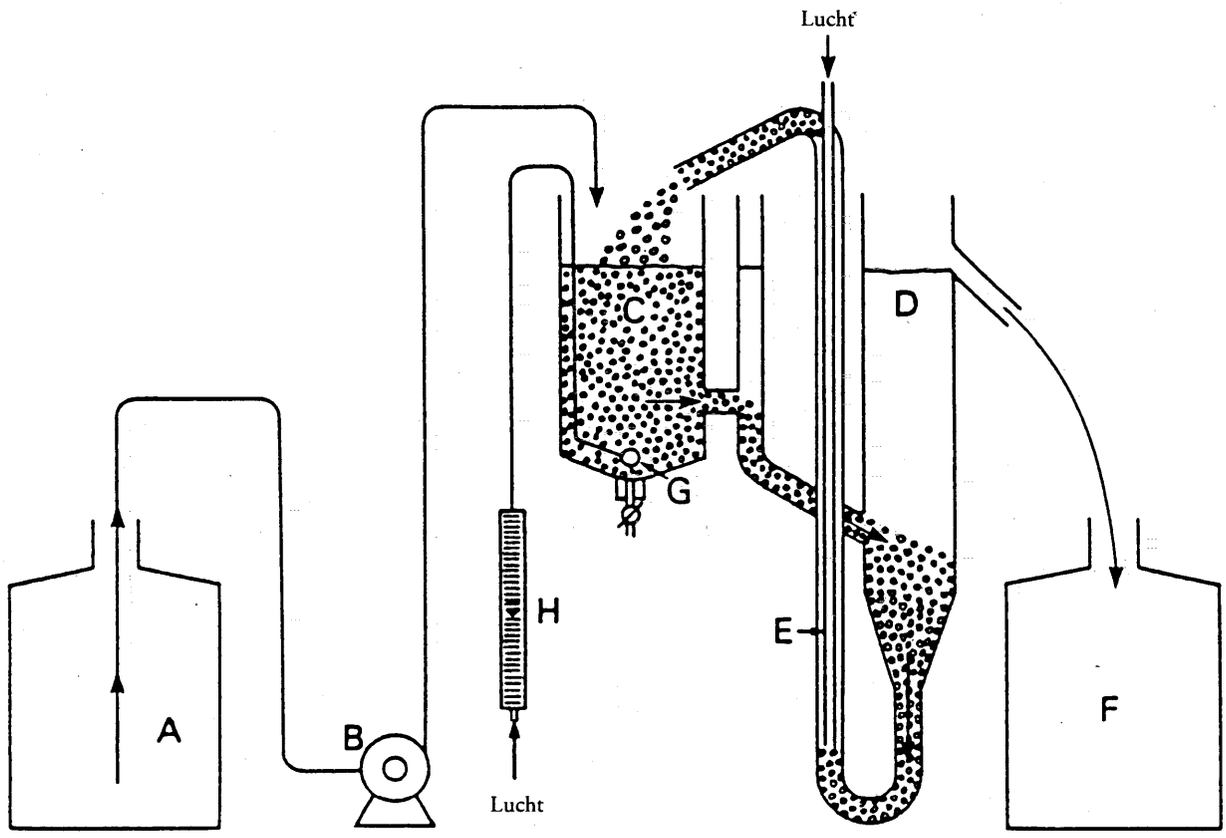
(4) Wierich, P., en Gerike, P., The Fate of Soluble Recalcitrant, and Adsorbing Compounds in Activated Sludge Plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety,* Vol. 5, no. 2, juni 1981, blz. 161 en 171.

(5) Richtlijnen 82/242/EEG en 82/243/EEG (*Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen* nr. L 109 van 22. 4. 1982) tot wijziging van de Richtlijnen 73/404/EEG en 73/405/EEG: Biologische afbreekbaarheid van detergenten (*Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen* nr. L 347 van 17. 12. 1973).

(6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreißertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fesenius-Zeitschrift für Analytische Chemie* 303 (1980), blz. 406.

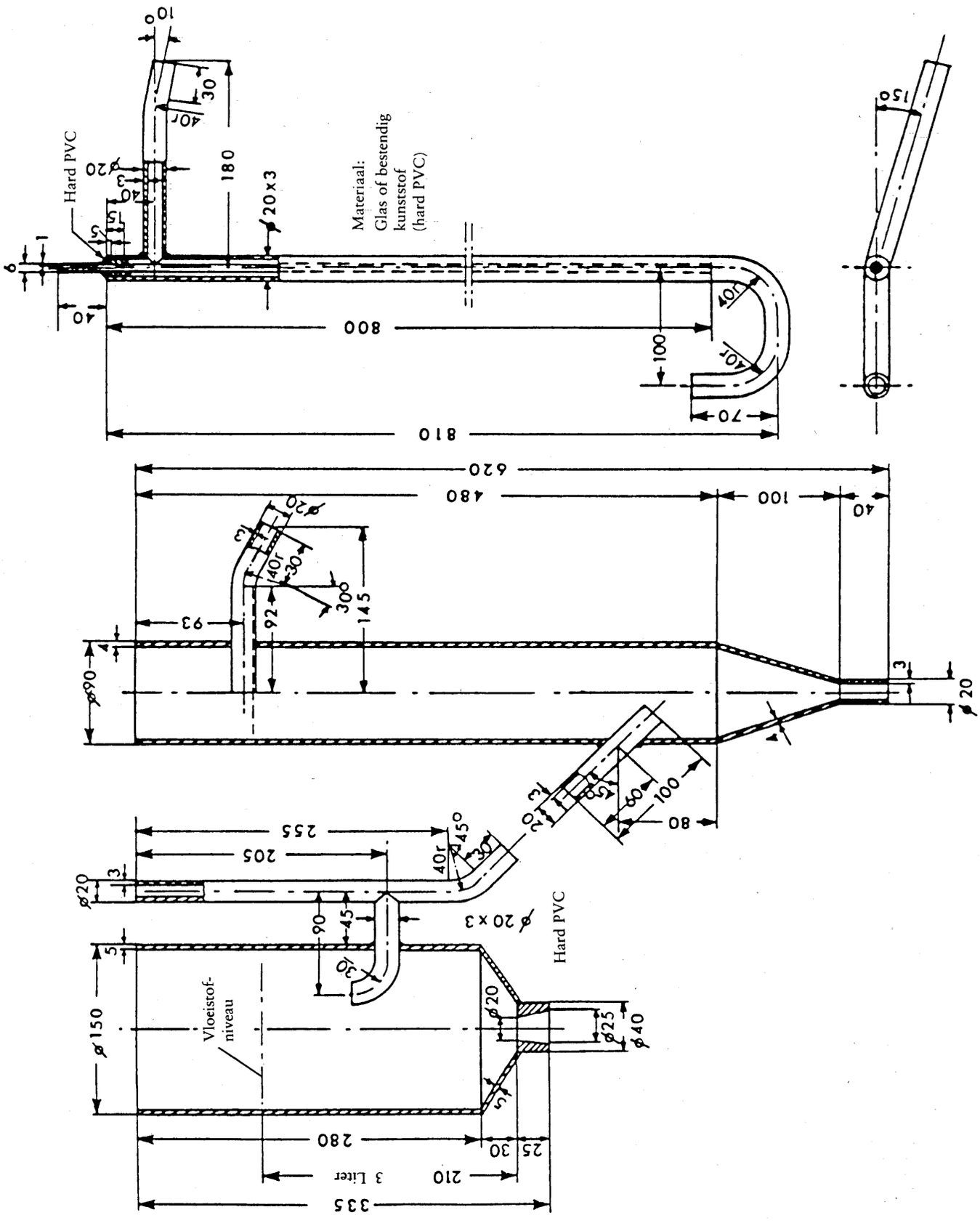
Aanhangsel 1

Figuur 1



A = Voorraadvat;
B = Doseerpomp;
C = Beluchtingsvat (inh. 3 l);
D = Bezinkvat;
E = Persluchtpomp;
F = Vergaarbak;
G = Beluchter;
H = Luchtstroommeter (indien gewenst).

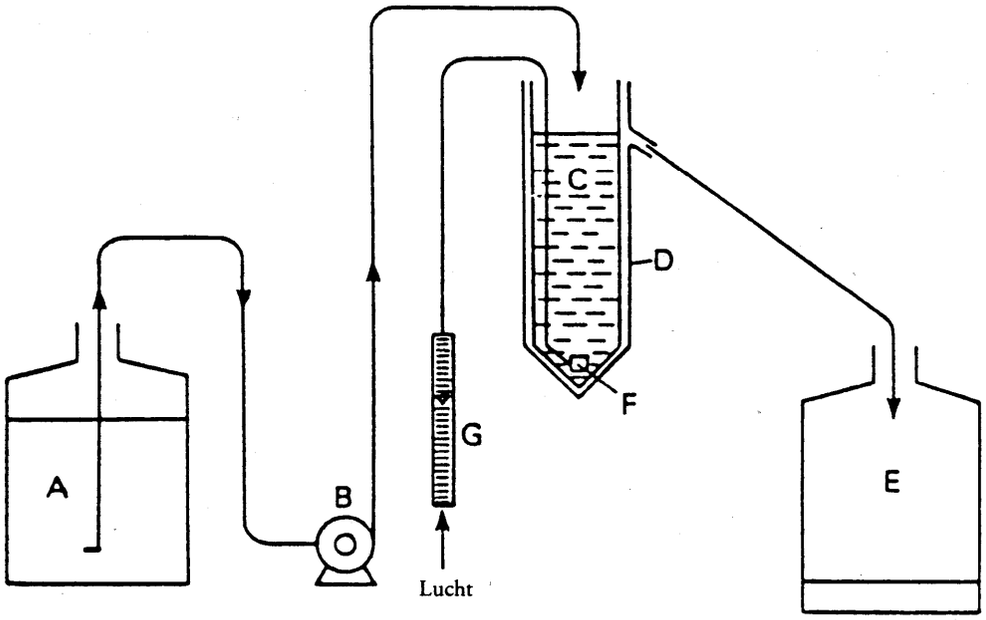
Figuur 2


Hard PVC
Materiaal:
Glas of bestendig
kunststof
(hard PVC)
Vloeistof-
niveau
3 Liter
Hard PVC

Aanhangsel 2

Figuur 1

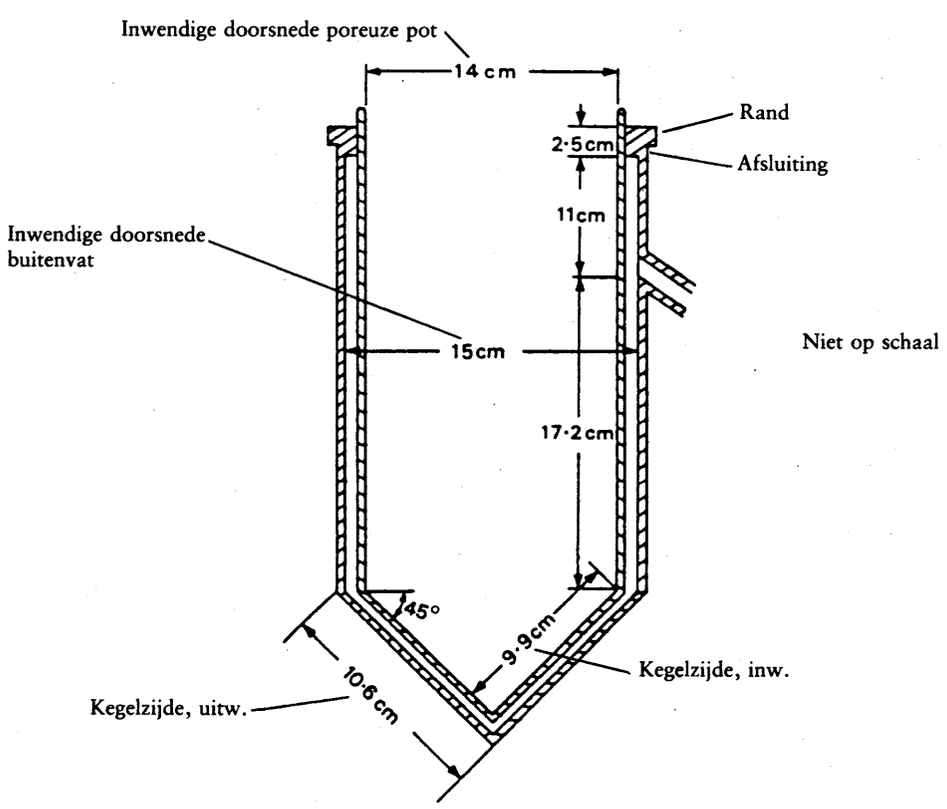
Apparatuur voor bepaling biologische afbreekbaarheid



A = Voorraadvat;
B = Doseerpomp;
C = Poreus beluchtingsvat;
D = Ondoordringbaar buitenvat;
E = Vergaarbak effluent;
F = Borrelaar;
G = Luchtmeter (indien gewenst).

Figuur 2

Maten van poreuze beluchtingsvat van 3 liter



Aanhangsel 3

Bedrijfsomstandigheden simulatietest actief slib

Controle in elke groep

Apparatuur

Bevestigingsproef OESO ☐
Poreuze pot ☐

Uitvoering

Een eenheid ☐
Twee gekoppelde eenheden ☐
Niet gekoppelde eenheden ☐

Overenting

Geen ☐
Actief slib ☐
Bovenstaande vloeistof ☐

Gemiddelde verblijftijd

Drie uur ☐
Zes uur ☐

Basisvoeding

Huishoudelijk afvalwater ☐
Kunstmatig afvalwater ☐

Entmateriaal

Secundaire effluent ☐
Samengesteld ☐
Actief slib ☐

Toevoeging testmateriaal

Bij de start ☐
Geleidelijk ☐
Na slibvorming ☐

Analyse

Specifiek ☐
COD (CZV) ☐
DOC ☐

BIOLOGISCHE AFBRAAK

ACTIEF SLIB: REMMING ADEMHALING

1. METHODE

1.1. Inleiding

In de hier beschreven methode wordt de invloed van een teststof op micro-organismen bepaald doordat de ademhalingssnelheid onder gedefinieerde omstandigheden wordt gemeten in aanwezigheid van verschillende concentraties van de teststof.

Deze methode is een snelle test, waarmee stoffen die de werking van aerobe microbiële zuiveringsinstallaties kunnen schaden, kunnen worden geïdentificeerd. Ook dient de test om een aanwijzing te krijgen van niet-remmende concentraties van stoffen waarvan de biologische afbreekbaarheid moet worden onderzocht.

De definitieve test kan worden voorafgegaan door een oriënterende proef. Deze levert informatie op over het concentratiegebied dat in de definitieve test dient te worden onderzocht.

De test bevat verder twee controles zonder teststof, welke respectievelijk aan het begin en aan het eind van de test worden ingezet. Bovendien wordt elke partij actief slib met behulp van een referentiestof gecontroleerd.

Deze methode verloopt het gemakkelijkst met stoffen die door de goede oplosbaarheid in water in de geringe vluchtigheid waarschijnlijk in het water blijven.

Voor stoffen met beperkte oplosbaarheid in het testmedium is het niet altijd mogelijk de EC_{50} te bepalen.

Resultaten gebaseerd op zuurstofopname kunnen tot onjuiste conclusies leiden, indien de teststof de neiging heeft de oxidatieve fosforylering te ontkoppelen.

Voor de uitvoering van de test is de volgende informatie over de teststof van nut:

— oplosbaarheid in water,

— dampdruk,

— structuurformule,

— zuiverheid.

Aanbeveling

Actief slib kan potentieel ziekteverwekkende organismen bevatten en dient daarom met voorzichtigheid te worden behandeld.

1.2. Definities en eenheden

Onder ademhalingssnelheid wordt verstaan het zuurstofverbruik van actief slib van micro-organismen in afvalwater. Dit wordt doorgaans uitgedrukt in mg O_2 per mg actief slib (droge stof) per uur.

Voor de berekening van het remmend effect van een bepaalde concentratie van de teststof wordt de ademhalingssnelheid uitgedrukt als percentage van het gemiddelde van de ademhalingssnelheden van de twee controles:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{RC_1 + RC_2}\right) \times 100 = \text{percentage remming}$$

waarin:

R_s = ademhalingssnelheid bij de geteste concentratie van de teststof,

RC_1 = ademhalingssnelheid van de eerste controle,

RC_2 = ademhalingssnelheid van de tweede controle.

De EC_{50} in deze methode is de concentratie van de teststof waarbij de ademhalingssnelheid 50 % bedraagt van die in de controle onder de in deze methode beschreven omstandigheden.

1.3. Referentiestoffen

Aanbevolen wordt 3,5-dichloorfenol, dat een bekende remmer van de ademhaling is, te gebruiken als referentiestof en hiervan de EC_{50} te testen ter controle van de gevoeligheid van het slib.

1.4. **Principe van de testmethode**

De ademhalingssnelheid van actief slib waaraan een standaardhoeveelheid kunstmatig afvalwater wordt toegevoegd, wordt gemeten na een contacttijd van 30 minuten of drie uur of beide. Ook wordt de ademhalingssnelheid van hetzelfde actief slib gemeten in aanwezigheid van verschillende concentraties van de teststof onder overigens identieke omstandigheden. De remmende werking van de teststof bij een bepaalde concentratie wordt weergegeven als percentage van de gemiddelde ademhalingssnelheden van twee controles. Een EC_{50}-waarde wordt berekend op grond van bepalingen bij verschillende concentraties.

1.5. **Kwaliteitsnormen**

De testresultaten zijn geldig indien:

— de ademhalingssnelheden van de twee controles onderling minder dan 15 % verschillen;

— de EC_{50} (30 minuten en/of drie uur) van 3,5-dichloorfenol 5 tot 30 mg/l bedraagt.

1.6. **Beschrijving van de testmethode**

1.6.1. *Reagentia*

1.6.1.1. Oplossingen van de teststof

De benodigde oplossingen van de teststof worden bij de aanvang van het onderzoek vers uit een voorraadoplossing bereid. Voor de voorraadoplossing kan, indien de onderstaande aanbevolen werkwijze wordt gevolgd, een concentratie van 0,5 g/l worden aangehouden.

1.6.1.2. Oplossing van de referentiestof

Een oplossing van 3,5-dichloorfenol kan bij voorbeeld worden bereid door 0,5 g 3,5-dichloorfenol op te lossen in 10 ml 1M NaOH, dan tot ongeveer 30 ml met gedestilleerd water te verdunnen, vervolgens onder roeren 0,5 M H_2SO_4 toe te voegen tot er een neerslag begint te ontstaan — hiervoor zal ongeveer 8 ml 0,5 M H_2SO_4 nodig zijn — en ten slotte het mengsel met gedestilleerd water tot 1 liter te verdunnen. De pH moet dan liggen tussen 7 en 8.

1.6.1.3. Kunstmatig afvalwater

Kunstmatig afvalwater wordt bereid door de volgende hoeveelheden stoffen op te lossen in 1 liter water:

— 16 g pepton,

— 11 g vleesextract,

— 3 g ureum,

— 0,7 g NaCl,

— 0,4 g $CaCl_2 . 2H_2O$,

— 0,2 g $MgSO_4 . 7H_2O$,

— 2,8 g K_2HPO_4.

Opmerking 1: Dit kunstmatige afvalwater is 100 maal zo geconcentreerd als hetgeen is beschreven in het technisch rapport van de OESO „Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents" van 11 juni 1976. Bovendien is er dikaliumwaterstoffosfaat toegevoegd.

Opmerking 2: Indien het kunstmatige afvalwater niet onmiddellijk wordt gebruikt, moet het in het donker bij 0 tot 4 °C bewaard worden gedurende maximaal één week, zodanig dat verandering in samenstelling vermeden wordt. Het kunstmatige afvalwater kan eventueel gesteriliseerd worden voor opslag of de pepton en het vleesextract kunnen kort voor de uitvoering van de test toegevoegd worden. Vóór het gebruik moet de oplossing goed worden gemengd en de pH worden bijgesteld.

1.6.2. *Apparatuur*

Meetapparaat: De precieze maten zijn niet van wezenlijk belang. Er moet echter geen vrije ruimte bovenin zijn en de elektrode moet goed zijn ingeklemd in de hals van het meetvat.

Benodigde apparatuur:

— meetapparaat (zie figuur 1),

— beluchtingstoestel,

— pH-elektrode en meetapparatuur,

— O_2-elektrode.

1.6.3. *Bereiding van het entmateriaal*

Als microbieel entmateriaal voor de test wordt doorgaans actief slib uit een zuiveringsinstallatie gebruikt die hoofdzakelijk huishoudelijk afvalwater behandelt.

Indien nodig kunnen de grotere deeltjes door bezinking, gedurende bij voorbeeld vijftien minuten, en door decanteren van de bovenlaag met fijnere deeltjes voor het gebruik afgescheiden worden. Een alternatieve methode is het gedurende enkele seconden homogeniseren van het slib met behulp van een mixer. Wanneer er reden is te veronderstellen dat er toxische componenten aanwezig zijn, moet het slib gewassen worden met leidingwater of een isotone oplossing. Na centrifugeren wordt het supernatant gedecanteerd (deze procedure moet drie keer herhaald worden).

Een klein gedeelte van het slib wordt gewogen en gedroogd. Aan de hand van dit resultaat kan de hoeveelheid nat slib berekend worden die in water gesuspendeerd dient te worden ten einde een actief slib te verkrijgen met een droge-stofgehalte tussen 2 en 4 g/l. Dit niveau correspondeert met een concentratie tussen 0,8 en 1,6 g/l in het testmedium, wanneer de hieronder aanbevolen procedure wordt gevolgd.

Indien het slib niet kan worden gebruikt op de dag dat het is verzameld, wordt aan elke liter actief slib die op bovenstaande wijze is bereid, 50 ml kunstmatig afvalwater per liter slib toegevoegd; dit mengsel wordt dan 's nachts belucht bij 20 ± 2 °C. Ook gedurende de dag wordt dit belucht. Voor gebruik wordt de pH gecontroleerd en indien nodig tussen 6 en 8 gebracht. Het gehalte aan gesuspendeerde vaste stof wordt bepaald als beschreven in de voorgaande alinea.

Indien dezelfde partij slib nodig is voor proeven op opeenvolgende dagen (ten hoogste vier dagen) wordt aan het eind van elke werkdag steeds 50 ml kunstmatig afvalwater toegevoegd.

1.6.4. *Uitvoering van de test*

Duur/contacttijd:	30 minuten en/of drie uur, gedurende welke tijd wordt belucht.
Water:	Drinkwater (zo nodig chloorvrij gemaakt).
Luchttoevoer:	Schone lucht, vrij van olie. Stroomsnelheid 0,5 tot 1 liter/minuut.
Meetapparaat:	Platbodemkolf, bij voorbeeld een BOD-kolf (zie figuur 1).
Zuurstofmeter:	Een geschikte zuurstofelektrode met een recorder.
Voedingsoplossing:	Kunstmatig afvalwater (zie boven).
Teststof:	De testoplossing wordt vers bereid bij de aanvang van de test.
Referentiestof:	bij voorbeeld 3,5-dichloorfenol (ten minste drie concentraties).
Controle:	Geënt monster zonder teststof.
Temperatuur:	20 ± 2 °C.

Voor zowel de teststof als de referentiestof kan voor de drie uur contactperiode de volgende werkwijze worden gevolgd:

Er worden verschillende vaten (bij voorbeeld bekerglazen van 1 l) gebruikt.

Er worden ten minste vijf concentraties gebruikt die onderling steeds met dezelfde factor (bij voorkeur kleiner dan 3,2) verschillen.

Op tijdstip „0" wordt 16 ml kunstmatig afvalwater aangevuld met water tot 300 ml. Hieraan wordt 200 ml microbieel entmateriaal toegevoegd en het totale mengsel (500 ml) wordt in het eerste vat gegoten (eerste controle C 1). De testvaten moeten continu belucht worden om er zeker van te zijn dat het gehalte aan opgelost O_2 niet lager wordt dan 2,5 mg/l en dat vlak voor de meting van de ademhalingssnelheid de O_2-concentratie ten minste 6,5 mg/l bedraagt.

Op tijdstip „vijftien minuten" (vijftien minuten is een willekeurige maar geschikte tijd) wordt bovenstaande procedure herhaald, behalve dat eerst aan de 16 ml kunstmatig afvalwater 100 ml voorraadoplossing van de teststof wordt toegevoegd voordat met water tot 300 ml en daarna met microbieel entmateriaal tot 500 ml wordt aangevuld. Dit mengsel wordt dan in een tweede vat gegoten en als boven belucht. Dit proces wordt met tussenpozen van vijftien minuten herhaald met verschillende volumes van de voorraadoplossing van de teststof, zodat een reeks vaten ontstaat met verschillende concentraties van de teststof. Ten slotte wordt een tweede controle bereid (C 2).

Na drie uur wordt de pH gemeten, wordt een goed homogeen monster van de inhoud van het eerste vat in het meetapparaat gegoten en wordt de ademhalingssnelheid gedurende maximaal tien minuten gemeten.

Deze bepaling wordt om de vijftien minuten herhaald met steeds een volgend vat, zodanig dat de contacttijd per vat drie uur is.

Met elke partij microbieel entmateriaal wordt de referentiestof op dezelfde wijze getest.

Wanneer er metingen na 30 minuten contact nodig zijn, moet een andere procedure worden gekozen (bij voorbeeld meer dan één zuurstofmeter).

Indien meting van het chemisch zuurstofverbruik nodig is, worden nog meer vaten bereid met teststof, kunstmatig afvalwater en water, maar zonder actief slib.

Het zuurstofverbruik wordt gemeten en geregistreerd na een beluchtingstijd van 30 minuten en/of drie uur (contacttijd).

2. GEGEVENS EN UITWERKING

De ademhalingssnelheid wordt berekend uit de recorderuitslag in mg O_2/l.h tussen ongeveer 6,5 mg O_2/l en 2,5 mg O_2/l of over een periode van tien minuten indien de ademhalingssnelheid laag is. Het gedeelte van de ademhalingscurve waarover de ademhalingssnelheid wordt gemeten moet rechtlijnig zijn.

Indien de ademhalingssnelheden van de twee controles niet binnen 15 % van elkaar liggen of de EC_{50} (30 minuten en/of drie uur) van de referentiestof niet in het aanvaardbare gebied (5 tot 30 mg/l voor 3,5-dichloorfenol) ligt, is de test niet geldig en moet deze worden herhaald.

Het percentage remming wordt bij elke testconcentratie berekend (zie 1.2). Het percentage remming wordt uitgezet tegen de concentratie op log-normaal- of log-waarschijnlijkheidspapier en daaruit wordt de EC_{50}-waarde herleid.

De 95 % betrouwbaarheidsgrenzen voor de EC_{50}-waarden kunnen volgens standaardprocedures worden bepaald.

3. VERSLAGGEVING

3.1. Testrapport

Het testrapport moet, indien mogelijk, bevatten:

- teststof: scheikundige gegevens ter identificatie;
- testsysteem: herkomst, concentratie en eventuele voorbehandeling van het actief slib;
- testomstandigheden:
  - de pH van het reactiemengsel voor de respiratiemeting,
  - testtemperatuur,
  - testduur,
  - referentiestof en de gemeten EC_{50} daarvan,
  - abiotische zuurstofopname (indien plaatsvindend);
- resultaten:
  - alle meetgegevens,
  - remmingscurve en methode ter bepaling van EC_{50},
  - EC_{50} en zo mogelijk 95 % betrouwbaarheidsgrenzen, EC_{20} en EC_{80},
  - alle waarnemingen en alle afwijkingen van deze testmethode die van invloed kunnen zijn op de resultaten.

3.2. Interpretatie van de gegevens

De EC_{50}-waarde dient te worden beschouwd als niet meer dan een aanwijzing voor de waarschijnlijke toxiciteit van de teststof, hetzij voor de afvalwaterbehandeling met actief slib, hetzij voor micro-organismen in afvalwater, omdat de in het milieu optredende ingewikkelde interacties in een laboratoriumproef niet voldoende kunnen worden nagebootst. Bovendien kunnen teststoffen die mogelijk remmend werken op de ammonia-oxydatie eveneens atypische inhibitiecurven opleveren. Dergelijke curven dient men met gepaste terughoudendheid te interpreteren.

4. **REFERENTIES**

(1) International Standard ISO 8192-1986.

(2) Broecker, B., en Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, blz. 165.

(3) Brown, D., Hitz, H. R., en Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 1981, blz. 245.

(4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Recommended Method No 103,* also described by:

(5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, blz. 80.

(6) Schefer, W., *Textilveredlung* 6, 1977, blz. 247.

(7) OESO, Parijs, 1981, *Testrichtlijn 209,* Besluit C(81) 30 def. van de Raad.

BIOLOGISCHE AFBRAAK

GEWIJZIGDE SCAS-TEST

1. METHODE

1.1. Inleiding

Doel van de methode is te bepalen in hoeverre in water oplosbare, niet-vluchtige organische verbindingen uiteindelijk biologisch afbreekbaar zijn, wanneer zij gedurende lange tijd worden blootgesteld aan relatief hoge concentraties micro-organismen. De micro-organismen worden gedurende deze tijd in leven gehouden door dagelijkse toevoeging van voorbezonken rioolwater. (Voor gebruik tijdens het weekend kan het rioolwater bij 4 °C worden bewaard. Tevens kan het synthetisch rioolwater van de OESO-bevestigende test worden gebruikt.)

Er kan fysisch-chemische adsorptie aan de gesuspendeerde deeltjes plaatsvinden; hiermee moet bij de interpretatie van de resultaten rekening worden gehouden (zie 3.2).

Vanwege de lange verblijftijd van de vloeibare fase (36 uur) en de tussentijdse toevoeging van nutriënten worden bij de test niet de omstandigheden in een rioolwaterzuiveringsinstallatie gesimuleerd. De resultaten met verschillende verbindingen wijzen erop dat de potentiële biologische afbraak bij de test hoog is.

De testomstandigheden zijn zeer gunstig voor de selectie en/of adaptatie van micro-organismen die de te testen verbinding kunnen afbreken.

(De procedure kan ook worden gebruikt voor het verkrijgen van geadapteerde inocula voor andere tests).

Bij deze methode wordt de uiteindelijke biologische afbreekbaarheid van de te testen verbindingen beoordeeld door meting van de concentratie opgelost organisch koolstof (Concentration Dissolved Organic Carbon = DOC concentration). Het verdient de voorkeur de DOC-concentratie na aanzuren en zuiveren te bepalen en niet als het verschil van $C_{totaal} - C_{anorg}$.

Wanneer tegelijkertijd een specifieke analysemethode wordt gebruikt, kan tevens worden nagegaan in hoeverre primaire afbraak van de verbinding plaatsvindt (verdwijning van de oorspronkelijke chemische structuur).

De methode kan alleen worden toegepast bij die organische verbindingen die bij de in de test gebruikte concentratie:

— in water oplosbaar zijn (ten minste 20 mg opgelost organisch koolstof per liter),

— een verwaarloosbare dampspanning hebben,

— niet remmend werken op bacteriën,

— binnen het testsysteem niet in belangrijke mate worden geadsorbeerd,

— niet door schuimvorming uit de oplossing verdwijnen.

Het gehalte aan organisch koolstof van het testmateriaal moet worden bepaald.

Gegevens over de onderlinge verhoudingen van de belangrijkste bestanddelen van het testmateriaal zijn nuttig voor de interpretatie van de verkregen resultaten, met name als de gevonden waarden laag of zeer laag zijn.

Gegevens over de toxiciteit van de stof voor micro-organismen kunnen nuttig zijn voor de interpretatie van lage waarden en voor de keuze van geschikte testconcentraties.

1.2. Definities en eenheden

C_T = concentratie van de testverbinding uitgedrukt in organisch koolstof, zoals deze aan het begin van de beluchtingsperiode in het bezonken rioolwater aanwezig is of daaraan wordt toegevoegd (mg/l),

C_t = concentratie opgelost organisch koolstof in het supernatans van het testmengsel aan het eind van de beluchtingsperiode (mg/l),

C_c = concentratie opgelost organisch koolstof in het supernatans van het controlemengsel aan het eind van de beluchtingsperiode (mg/l).

Bij deze methode wordt biologische afbraak gedefinieerd als het verdwijnen van organisch koolstof. De biologische afbraak kan worden uitgedrukt als:

1. De verdwenen hoeveelheid als percentage van de per dag toegevoegde hoeveelheid verbinding (D_{da}):

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad [1]$$

D_{da} = afbraak/dagelijks toegevoegd („degradation/daily addition").

2. De verdwenen hoeveelheid als percentage van de aan het begin van elke dag aanwezige hoeveelheid verbinding (D_{ssd}):

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2\,a)]$$

$$\simeq \frac{2C_T - 2C(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2\,b)]$$

D_{ssd} = afbraak/begin dag aanwezig („degradation/substance start of day"),

de indexen i en (i + 1) verwijzen naar de dag van meting.

Vergelijking 2 a) wordt aanbevolen wanneer de DOC-concentratie in het effluent van dag tot dag verschilt, terwijl vergelijking 2 b) kan worden gebruikt wanneer de DOC-concentratie in het effluent van dag tot dag relatief constant blijft.

1.3. **Referentieverbindingen**

In sommige gevallen kan bij het onderzoek van een nieuwe verbinding het gebruik van referentieverbindingen nuttig zijn; hier worden echter geen specifieke referentieverbindingen aanbevolen.

Er worden gegevens verschaft over een aantal verbindingen waarvoor een ringonderzoek is uitgevoerd (zie aanhangsel 1), voornamelijk om de methode zo nu en dan te kunnen ijken en om bij gebruik van een andere methode de resultaten te kunnen vergelijken.

1.4. **Principe van de testmethode**

Actief slib uit een rioolwaterzuiveringsinstallatie wordt in een semi-continue actief-slibinstallatie (SCAS) gebracht. De te testen verbinding en voorbezonken rioolwater worden toegevoegd en het mengsel wordt gedurende 23 uur belucht. Vervolgens wordt de beluchting gestopt, laat men het slib bezinken en wordt het supernatans verwijderd.

Het in de beluchtingskamer achtergebleven slib wordt vervolgens vermengd met een nieuwe hoeveelheid van de te testen verbinding en rioolwater en de cyclus wordt herhaald.

De biologische afbraak wordt gemeten door bepaling van de hoeveelheid opgelost organisch koolstof in het supernatans. Deze waarde wordt vergeleken met de waarde die wordt verkregen voor het supernatans van controleslib, waaraan alleen voorbezonken rioolwater is toegevoegd.

Wanneer een specifieke analysemethode wordt gebruikt, kunnen ook veranderingen in de concentratie van de uitgangsstof ten gevolge van biologische afbraak worden gemeten (primaire biologische afbreekbaarheid).

1.5. **Kwaliteitscriteria**

De reproduceerbaarheid van deze methode, gebaseerd op het verdwijnen van opgelost organisch koolstof, is nog niet aangetoond. (Wanneer rekening wordt gehouden met primaire biologische afbraak, worden zeer nauwkeurige gegevens verkregen voor materiaal dat in hoge mate afbreekbaar is.)

De gevoeligheid van de methode wordt grotendeels bepaald door de variatie in de blanco-bepaling en in mindere mate door de nauwkeurigheid van de bepaling van opgelost organisch koolstof en de concentratie van de te testen verbinding in de vloeistof aan het begin van elke cyclus.

1.6. **Beschrijving van de testprocedure**

1.6.1. *Voorbereidingen*

Voor elke te testen verbinding en voor de blanco-bepalingen moet een voldoende aantal schone beluchtingskamers (de oorspronkelijke SCAS-testopstelling van 1,5 l kan tevens worden gebruikt) worden opgesteld, voorzien van luchtinlaatbuizen (figuur 1). De perslucht voor de testopstelling wordt gefiltreerd door een grof filter met watten, mag geen organisch koolstof bevatten en moet vooraf worden verzadigd met water om verliezen door verdamping zoveel mogelijk te voorkomen.

Uit een actief-slibinstallatie, waar voornamelijk huishoudelijk afvalwater wordt gereinigd, wordt een monster actief-slibsuspensie genomen, dat 1 tot 4 g gesuspendeerde stoffen/l bevat.

Voor elke beluchtingskamer is ongeveer 150 ml van de gemengde vloeistof nodig.

Er worden voorraadoplossingen van de te testen verbinding in gedestilleerd water gemaakt; onder normale omstandigheden is een concentratie van 400 mg/l berekend als organisch koolstof nodig, zodat de concentratie van de te testen verbinding, als er geen biologische afbraak optreedt, aan het begin van elke beluchtingscyclus 20 mg koolstof/l is.

Hogere concentraties zijn mogelijk als de toxiciteit voor micro-organismen dit toelaat.

De concentratie organisch koolstof in de voorraadoplossingen wordt gemeten.

1.6.2. *Testomstandigheden*

De test dient te worden uitgevoerd bij 20 tot 25 °C.

Er wordt een hoge concentratie aerobe micro-organismen gebruikt (1 tot 4 g gesuspendeerd materiaal per liter) en de effectieve verblijfstijd is 36 uur. Het koolstofhoudend materiaal in het rioolwater wordt in hoge mate geoxideerd, onder normale omstandigheden binnen acht uur na het begin van elke beluchtingscyclus. Daarna is de ademhaling in het slib gedurende de rest van de beluchtingsperiode endogeen; gedurende deze periode is de te testen verbinding het enige beschikbare substraat, tenzij ook deze snel wordt gemetaboliseerd. Deze kenmerken, alsmede het feit dat het testmengsel bij gebruik van huishoudelijk afvalwater als medium elke dag opnieuw wordt geënt, leveren zeer gunstige omstandigheden op voor zowel adaptatie als een hoge mate van biologische afbraak.

1.6.3. *Uitvoering van de test*

Uit een actief-slibinstallatie voor in hoofdzaak huishoudelijk afvalwater of een laboratoriuminstallatie wordt een gemengd vloeistofmonster genomen en tot gebruik in het laboratorium aeroob bewaard. Elke beluchtingskamer (ook die voor de blanco-bepaling) wordt gevuld met 150 ml van de gemengde vloeistof (wanneer de oorspronkelijke SCAS-testapparatuur wordt gebruikt, moeten de genoemde volumes met 10 worden vermenigvuldigd) en de beluchting wordt gestart. Na 23 uur wordt de beluchting gestopt en laat men het slib gedurende 45 minuten bezinken. De kraan wordt opengedraaid en uit elke beluchtingskamer tapt men 100 ml van het supernatans af. Vlak voor gebruik wordt een hoeveelheid voorbezonken rioolwater genomen; 100 ml daarvan wordt toegevoegd aan het in elke beluchtingskamer achtergebleven slib. De beluchting wordt opnieuw gestart. In deze fase wordt geen testmateriaal toegevoegd; elke dag wordt uitsluitend huishoudelijk afvalwater in de beluchtingskamer gebracht, tot er na bezinken een helder supernatans wordt verkregen. Dit duurt meestal maximaal twee weken; de hoeveelheid opgelost organisch koolstof in het supernatans aan het eind van elke beluchtingscyclus benadert dan een constante waarde.

Aan het eind van deze periode wordt het bezonken slib uit de verschillende kamers gemengd en wordt in elke kamer 50 ml van dit gemengde slib gebracht.

In het testvat voor de blanco-bepaling worden 95 ml voorbezonken rioolwater en 5 ml water gebracht. In de overige testvaten wordt 95 ml voorbezonken rioolwater en 5 ml van de voorraadoplossing (400 mg/l) van de te testen verbinding gebracht. De beluchting wordt opnieuw gestart en 23 uur later stopgezet. Vervolgens laat men het slib 45 minuten bezinken; het supernatans wordt afgetapt en de hoeveelheid opgeloste organische koolstof wordt bepaald.

Deze vul- en aftapprocedure wordt gedurende de hele test elke dag herhaald.

Het is wellicht nodig vóór het bezinken de wanden van de kamers schoon te maken, om te voorkomen dat zich hierop boven het vloeistofniveau vaste deeltjes gaan afzetten. Om onderlinge verontreiniging te voorkomen wordt voor elke kamer een afzonderlijke schraper of borstel gebruikt.

De hoeveelheid opgelost organisch koolstof in het supernatans wordt bij voorkeur elke dag bepaald, hoewel het toelaatbaar is de analyse minder vaak uit te voeren. Vóór analyse wordt de vloeistof gefiltreerd door gewassen membraanfilters van 0,45 µm of gecentrifugeerd. Membraanfilters kunnen worden gebruikt, als vaststaat dat deze tijdens de filtratie geen koolstof afgeven en ook de testverbinding niet adsorberen. De temperatuur van het monster mag in de centrifuge niet hoger zijn dan 40 °C.

Er zijn geen vaste regels voor de tijdsduur van de test voor verbindingen die niet of nauwelijks biologisch worden afgebroken, maar de ervaring leert dat deze in het algemeen minimaal 12 weken en maximaal 26 weken moet zijn.

2. GEGEVENS EN EVALUATIE

De hoeveelheid opgelost organisch koolstof in het supernatans bij de testbepalingen en de blanco-bepalingen worden tegen de tijd uitgezet.

Naarmate de biologische afbraak ten einde loopt, zullen de waarden voor de testbepalingen in de buurt komen te liggen van de blanco-waarden. Wanneer het verschil tussen de twee waarden bij drie opeenvolgende metingen constant blijft, worden er nog zoveel metingen uitgevoerd dat statistische behandeling van de gegevens mogelijk is en wordt het percentage van de te testen verbinding dat biologisch wordt afgebroken berekend (D_{da} of D_{ssd}, zie 1.2).

3. RAPPORTAGE

3.1. Testrapport

Het testrapport moet, indien mogelijk, bevatten:

— alle gegevens over de aard van het rioolwater en de gebruikte proefopstelling en de resultaten van de bepalingen met de te testen verbinding en met de eventueel gebruikte referentieverbinding en de resultaten van de blanco-bepalingen,

— de temperatuur,

— de afbraakcurve met een beschrijving en de berekeningswijze (zie 1.2),

— datum en plaats van monsterneming van het actief slib en het rioolwater en gegevens over adaptatie daarvan, concentratie, enz.,

— wetenschappelijke motivering voor veranderingen in de testprocedure,

— handtekening en datum.

3.2. Interpretatie van de resultaten

Aangezien de via deze methode te testen verbinding niet gemakkelijk biologisch afbreekbaar zal zijn, zal een verlaging van de DOC-concentratie uitsluitend ten gevolge van biologische afbraak onder normale omstandigheden geleidelijk plaatsvinden in de loop van dagen of weken, behalve in gevallen waar een plotselinge adaptatie optreedt, hetgeen blijkt uit een abrupte concentratieverlaging na enkele weken.

Fysisch-chemische adsorptie kan echter soms een belangrijke rol spelen; in dat geval verdwijnt het toegevoegde DOC reeds in het begin volledig of gedeeltelijk. Wat er vervolgens gebeurt, is afhankelijk van factoren als de mate van adsorptie en de concentratie van gesuspendeerde deeltjes in het afgetapte effluent. Meestal is het verschil in DOC-concentratie in het supernatans tussen de blanco-bepaling en de testbepaling aanvankelijk gering en neemt dit geleidelijk toe tot een nieuwe waarde die gedurende de rest van het experiment constant blijft, tenzij adaptatie optreedt.

Om onderscheid te kunnen maken tussen biologische afbraak (of gedeeltelijke biologische afbraak) en adsorptie moeten andere tests worden uitgevoerd. Dit kan op een aantal manieren gebeuren, maar het meest ondubbelzinnig is het supernatans of het slib als inoculum te gebruiken bij een elementair (bij voorkeur respirometrisch) experiment.

Testverbindingen, waarbij in dit experiment een grote verlaging van de DOC-concentratie optreedt, welke verlaging niet wordt veroorzaakt door adsorptie, moeten worden beschouwd als eventueel biologisch afbreekbaar. Een gedeeltelijke, niet door adsorptie veroorzaakte verlaging wijst erop dat de verbinding althans enigermate biologisch wordt afgebroken.

Een geringe of in het geheel geen verlaging van de DOC-concentratie kan worden veroorzaakt door inhibitie van de micro-organismen door de te testen verbinding; dit kan ook blijken uit afbraak en verlies van slib, waarbij een troebel supernatans ontstaat. In dit geval moet de test worden herhaald met een lagere concentratie van de te testen verbinding.

Door het gebruik van specifieke analysemethoden of van met ^{14}C gelabelde testverbindingen kan een grotere gevoeligheid worden bereikt. In het geval van ^{14}C-testverbindingen wordt de biologische afbraak aangetoond door het ontstaan van $^{14}CO_2$.

Wanneer er bij de resultaten ook gegevens worden vermeld over primaire biologische afbraak, moet, indien mogelijk, worden verklaard door welke verandering in de chemische structuur een geringere hoeveelheid van de oorspronkelijke testverbinding wordt aangetroffen.

De bruikbaarheid van de analysemethode moet worden aangetoond en de resultaten van de blanco-bepaling moeten worden vermeld.

4. REFERENTIES

(1) OESO, Parijs, 1981, *Testrichtlijn 302 A,* Besluit C(81) 30 def. van de Raad.

Aanhangsel 1

SCAS-test: voorbeeld van resultaten

Chemische stof	C_T (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/l)	Percentage biodegradatie, D_{da}	Testduur (dagen)
4-acetyl aminobenzeen sulfonaat	17,2	2,0	85	40
Tetrapropyleenbenzeen sulfonaat	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
Diëthyleenglycol	16,5	0,2	98,8	40
Aniline	16,9	1,7	95,9	40
Cyclopentaan tetracarboxylaat	17,9	3,2	81,1	120

Aanhangsel 2

Voorbeeld van testopstelling

Figuur 1

