

Aanhangsel 4

TRANSACTIVATIEBEPALING OP BASIS VAN STABIEL GETRANFECTEERDE HUMANE OESTROGEENRECEPTOR-A VOOR HET OPSPOREN VAN OESTROGEENAGONISTISCHE EN -ANTAGONISTISCHE ACTIVITEIT VAN CHEMISCHE STOFFEN, WAARBIJ GEBRUIKGEMAAKT WORDT VAN DE CELLIJN ERA CALUX

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN (ZIE OOK ALGEMENE INLEIDING)

1. Voor de ERa CALUX-transactivatiebepaling wordt gebruikgemaakt van de humane cellijn U2OS voor het opsporen van oestrogeenagonistische en -antagonistische activiteit gemedieerd door de humane oestrogeenreceptor-alfa (hERa). In de valideringsstudie voor de stabiel getransfecteerde ERa CALUX-bioassay door BioDetection Systems BV (Amsterdam, Nederland) werden de relevantie en betrouwbaarheid van de bepaling voor het beoogde doel aangetoond (1). De cellijn ERa CALUX brengt enkel de stabiel getransfecteerde humane ERa tot expressie (2) (3).
2. Deze bepaling is speciaal ontworpen voor het opsporen van hERa-gemedieerde transactivatie door meting van bioluminescentie als eindpunt. In bioassays wordt veel gebruikgemaakt van bioluminescentie vanwege de hoge signaal-ruisverhouding (4).
3. Van fyto-oestrogeenconcentraties hoger dan 1 µM is echter overactivatie van het luciferasereporter gen gerapporteerd, wat leidt tot niet-receptor-gemedieerde luminescentie (5) (6) (7). Bij transactivatiebepalingen op basis van stabiel getransfecteerde ER moeten hogere concentraties van fyto-oestrogenen of andere, vergelijkbare verbindingen die de expressie van luciferase kunnen overactiveren, dan ook zorgvuldig worden bestudeerd (zie aanhangsel 2).
4. Alvorens deze bepaling te gebruiken met het oog op regelgeving, moeten de „ALGEMENE INLEIDING” en „COMPONENTEN VAN DE ER TA-BEPALING” worden geraadpleegd. De in deze testmethode gebruikte definities en afkortingen staan in aanhangsel 1.

PRINCIPE VAN DE BEPALING (ZIE OOK DE ALGEMENE INLEIDING)

5. De bioassay wordt gebruikt voor het beoordelen van de ER-ligandbinding en de daarop volgende translocatie van het receptor-ligandcomplex naar de nucleus. In de nucleus bindt het receptor-ligandcomplex aan specifieke DNA-respons-elementen en transactiveert het een vuurvlieg-luciferasereporter gen, wat leidt tot een verhoogde cellulaire expressie van het luciferase-enzym. Na toevoeging van luciferine, het substraat van luciferase, wordt dit luciferine omgezet in een bioluminescent product. Het vrijkomende licht kan gemakkelijk worden gedetecteerd en gekwantificeerd met behulp van een luminometer.
6. In dit testsysteem worden stabiel getransfecteerde ERa CALUX-cellen gebruikt. ERa CALUX-cellen zijn afgeleid van de humane osteoblastische osteosarcomocellijn U2OS. Humane U2OS-cellen werden stabiel getransfecteerd met 3xHRE-TATA-Luc en pSG5-neo-hERa volgens de calciumfosfaat-coprecipitatie methode. De cellijn U2OS werd als beste keuze geselecteerd om als op oestrogenen (en andere steroïde hormonen) reagerende reporter cellijn te dienen op basis van de waarneming dat de cellijn U2OS nauwelijks tot geen endogene receptoractiviteit vertoonde. Het ontbreken van endogene receptoren werd vastgesteld met alleen luciferasereporterplasmiden: na toevoeging van receptorliganden werd geen enkele activiteit waargenomen. Bovendien ondersteunde deze cellijn sterke hormoon-gemedieerde responsen bij tijdelijke introductie van verwante receptoren(2) (3) (8).
7. Voor het testen van chemische stoffen op oestrogene of anti-oestrogene activiteit met behulp van de cellijn ERa CALUX wordt eerst een screeningstrun uitgevoerd, gevolgd door de integrale teststruns. In de screeningstrun worden de oplosbaarheid, de cytotoxiciteit en een beperkt concentratiebereik van de teststoffen bepaald ten behoeve van de integrale teststruns. In de integrale tests worden de beperkte concentratiebereiken van de teststoffen getest in de ERa CALUX-bioassays, waarna de teststoffen worden ingedeeld op agonisme of antagonisme.

- De criteria voor gegevensinterpretatie worden nader beschreven in punt 59. Samenvattend wordt een teststof als positief beoordeeld voor agonisme wanneer ten minste twee opeenvolgende concentraties van de teststof een respons opleveren die gelijk is aan of sterker dan 10 % van de maximale respons van de referentiestandaard 17 β -oestradiol (PC₁₀). Een teststof wordt als positief beoordeeld voor antagonisme wanneer ten minste twee opeenvolgende concentraties van de teststof een respons opleveren die gelijk is aan of zwakker dan 80 % van de maximale respons van de referentiestandaard tamoxifen (PC₈₀).

PROCEDURE

Cellijnen

- Voor de bepaling moet de stabiel getransfecteerde cellijn U2OS-ER α CALUX worden gebruikt. Deze cellijn is verkrijgbaar met een technische licentieovereenkomst bij Detection Systems BV, Amsterdam, Nederland.
- Er mogen alleen mycoplasma-vrije celculturen worden gebruikt. De gebruikte celpartijen moeten hetzij gecertificeerd negatief zijn voor verontreiniging met mycoplasma of er moet vóór gebruik een mycoplasma-test worden uitgevoerd. Voor een gevoelige detectie van mycoplasma-infectie moet de methode PT-PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) worden gebruikt (9).

Stabiliteit van de cellijn

- Om de stabiliteit en de integriteit van de CALUX-cellen te behouden, moeten de cellen worden bewaard in vloeibare stikstof (-80 °C). Nadat ze zijn ontdooid om een nieuwe kweek te beginnen, moeten de cellen ten minste tweemaal worden overgeënt alvorens te worden gebruikt ter beoordeling van de oestrogenagonistische en -antagonistische activiteit van chemische stoffen. De cellen mogen niet meer dan 30 passages worden overgeënt.
- Om de stabiliteit van de cellijn in de loop van de tijd te controleren moeten de responsiviteit van de agonistische en antagonistische testsystemen worden geverifieerd door de EC₅₀ of IC₅₀ van de referentiestandaard te beoordelen. Bovendien moet de relatieve inductie van de positieve controle (PC) en de negatieve controle (NC) worden gemonitord. De resultaten moeten overeenkomen met de aanvaardbaarheidscriteria voor de agonistische (tabel 3C) of antagonistische ER α CALUX-bioassay (tabel 4C). De referentiestandaarden, positieve controles en negatieve controles worden gegeven in tabel 1 voor agonisme en tabel 2 voor antagonisme.

Omstandigheden voor het kweken en uitplaten van de cellen

- De U2OS-cellen moeten worden gekweekt in groeimedium (1:1 DMEM/F12-medium met fenolrood als pH-indicator, aangevuld met 7,5 % foetaal runderserum, 1 % niet-essentiële aminozuren, 10 eenheden/ml penicilline, streptomycine en geneticine (G-418) als selectiemarker. De cellen worden in een CO₂-incubator (5 % CO₂) geplaatst bij 37 °C en 100 % vochtigheid. Wanneer de cellen 85-95 % confluentie bereiken, moeten ze hetzij worden overgeënt, hetzij worden voorbereid om in microtiterplaten met 96 putjes te worden geënt. In het tweede geval worden de cellen geresuspendeerd in een concentratie van 1×10^5 cellen/ml in oestrogenvrij medium (1:1 DMEM/F12-medium zonder fenolrood, met met dextraan beklede kool behandeld foetaal runderserum (5 % v/v), niet-essentiële aminozuren (1 % v/v), 10 eenheden/ml penicilline en streptomycine) en uitgeplaat in de putjes van microtiterplaten met 96 putjes (100 μ l gehomogeniseerde celsuspensie). Alvorens te worden blootgesteld worden de cellen 24 uur gepreincubeerd in een CO₂-incubator (5 % CO₂, 37 °C, 100 % vochtigheid). Het kunststof laboratoriumgerei moet oestrogenvrij zijn.

Aanvaardbaarheidscriteria

- De agonistische activiteit en antagonistische activiteit van de teststof(fen) worden getest in testreeksen. Een testreeks bestaat uit maximaal 6 microtiterplaten. Elke testreeks omvat ten minste 1 volledige verdunningsreeks van een referentiestandaard, een positieve controle, een negatieve controle en oplosmiddelcontroles. In figuur 1 en figuur 2 wordt de plaatindeling weergegeven voor agonistische en antagonistische testreeksen.

15. Elke verdunning van de referentiestandaarden, teststoffen, alle oplosmiddelcontroles en de positieve en negatieve controles moeten in drievoud worden geanalyseerd. Elke drievoudige analyse moet aan de eisen in tabel 3A en tabel 4A voldoen.
16. In elke testreeks wordt in de eerste plaat een volledige verdunningsreeks van de referentiestandaard (17β -oestradiol voor agonisme; tamoxifen voor antagonisme) gemeten. Om te zorgen dat de analyseresultaten van de overige 5 microtiterplaten kunnen worden vergeleken met de eerste microtiterplaat, die de volledige concentratie-responscurve van de referentiestandaard bevat, moeten alle platen 3 controles bevatten: oplosmiddelcontrole, de hoogste geteste concentratie van de referentiestandaard en de concentratie van de referentiestandaard die de EC_{50} (agonisme) of de IC_{50} (antagonisme) benadert. De verhouding tussen de controlegemiddelden in de eerste plaat en de overige 5 platen moet aan de eisen in tabel 3C (agonisme) of tabel 4C (antagonisme) voldoen.
17. Voor elk van de microtiterplaten in een testreeks wordt de z-factor berekend (10). De z-factor moet worden berekend aan de hand van de responsen bij de hoogste en de laatste concentratie van de referentiestandaard. Een microtiterplaat wordt als valide beschouwd als hij aan de eisen in tabel 3C (agonisme) of tabel 4C (antagonisme) voldoet.
18. De referentiestandaard moet een sigmoïdale dosis-responscurve laten zien. De EC_{50} of IC_{50} die wordt afgeleid uit de respons van de verdunningsreeks van de referentiestandaard, moet aan de eisen in tabel 3C (agonisme) of tabel 4C (antagonisme) voldoen.
19. In elke testreeks moet een positieve en een negatieve controle worden opgenomen. De berekende relatieve inductie van zowel de positieve als de negatieve controle moet aan de eisen in tabel 3C (agonisme) of tabel 4C (antagonisme) voldoen.
20. Tijdens alle metingen moet de inductiefactor van de hoogste concentratie van de referentiestandaard worden gemeten door de gemiddelde hoogste respons voor de referentiestandaard 17β -oestradiol in relatieve lichteenheden (RLU) te delen door de gemiddelde RLU-respons voor de referentie-oplosmiddelcontrole. Deze inductiefactor moet voldoen aan de minimumeisen voor de x-voudige inductie in tabel 3C (agonisme) of tabel 4C (antagonisme).
21. Alleen microtiterplaten die aan alle bovengenoemde aanvaardbaarheidscriteria voldoen, worden als valide beschouwd en mogen worden gebruikt om de respons van de teststoffen te beoordelen.
22. De aanvaardbaarheidscriteria gelden voor zowel de screeningstest als de integrale testruns.

Tabel 1

Concentraties van de referentiestandaard, PC en NC voor de agonistische CALUX-bioassay

	Stof	CAS RN	Testbereik (M)
Referentiestandaard	17β -oestradiol	50-28-2	1×10^{-13} - 1×10^{-10}
Positieve controle (PC)	17α -methyltestosteron	58-18-4	3×10^{-6}
Negatieve controle (NC)	corticosteron	50-22-6	1×10^{-8}

Tabel 2

Concentraties van de referentiestandaard, positieve controle (PC) en negatieve controle (NC) voor de antagonistische CALUX-bioassay

	Stof	CAS RN	Testbereik (M)
Referentiestandaard	tamoxifen	10540-29-1	$3 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-5}$
Positieve controle (PC)	4-hydroxytamoxifen	68047-06-3	1×10^{-9}
Negatieve controle (NC)	resveratrol	501-36-0	1×10^{-5}

Tabel 3

Aanvaardbaarheidscriteria voor de agonistische ER α CALUX bioassay

A – afzonderlijke monsters in een plaat		Criterium
1	Maximale %SD voor putjes in drievoud (voor NC, PC, elke verdunning van de teststof en de referentiestandaard, behalve C0)	< 15 %
2	Maximale %SD voor putjes in drievoud (voor referentiestandaard en controles met het oplosmiddel voor de teststof (C0, SC))	< 30 %
3	Maximale LDH-lekkage, als maat voor de cytotoxiciteit.	< 120 %
B – binnen een enkele microtiterplaat		
4	Verhouding tussen de controle met het oplosmiddel van de referentiestandaard (C0; plaat 1) en de controle met het oplosmiddel van de teststof (SC; platen 2 tot x)	0,5 tot 2,0
5	Verhouding tussen de EC ₅₀ bij benadering en de hoogste concentraties van de referentiestandaard in plaat 1 enerzijds en de EC ₅₀ bij benadering en de hoogste concentraties van de referentiestandaard in plaat 2 tot x (C4, C8) anderzijds	0,70 tot 1,30
6	Z-factor voor elke plaat	> 0,6
C – binnen een afzonderlijke reeks analyses (alle platen in één reeks)		
7	Sigmoidale curve van de referentiestandaard	Ja (17 β -oestradiol)
8	EC ₅₀ -bereik referentiestandaard 17 β -oestradiol	$4 \times 10^{-12} - 4 \times 10^{-11}$ M
9	Minimale x-voudige inductie van de hoogste 17 β -oestradiolconcentratie ten opzichte van de controle met het oplosmiddel van de referentiestandaard.	5
10	Relatieve inductie (%) PC	> 30 %
11	Relatieve inductie (%) NC	< 10 %

PC: positieve controle; NC: negatieve controle; SC: controle met het oplosmiddel van de teststof; C0: controle met het oplosmiddel van de referentiestandaard; SD: standaarddeviatie; LDH: lactaatdehydrogenase

Tabel 4

Aanvaardbaarheidscriteria voor de antagonistische ER α CALUX bioassay

A – afzonderlijke monsters in een plaat		Criterium
1	Maximale %SD voor putjes in drievoud (voor NC, PC, elke verdunning van de teststof, de referentiestandaard, en de oplosmiddelcontrole (C0))	< 15 %
2	Maximale %SD van de putjes in drievoud (voor VC en hoogste concentratie van de referentiestandaard (C8))	< 30 %
3	Maximale LDH-lekkage, als maat voor de cytotoxiciteit.	< 120 %
B – binnen een enkele microtiterplaat		
4	Verhouding tussen de controle met het oplosmiddel van de referentiestandaard (C0; plaat 1) en de controle met het oplosmiddel van de teststof (SC; platen 2 tot x)	0,70 tot 1,30
5	Verhouding tussen de IC ₅₀ bij benadering van de referentiestandaard in plaat 1 en de IC ₅₀ bij benadering van de referentiestandaard in plaat 2 tot x (C4)	0,70 tot 1,30
6	Verhouding van de hoogste concentraties van de referentiestandaard in plaat 1 en de hoogste concentraties van de referentiestandaard in plaat 2 tot x (C8)	0,50 tot 2,0
7	Z-factor voor elke plaat	> 0,6
C – binnen een afzonderlijke reeks analyses (alle platen in één reeks)		
8	Sigmoidale curve van de referentiestandaard	Ja (tamoxifen)
9	IC ₅₀ -bereik referentiestandaard (tamoxifen)	$1 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-7}$ M
10	Minimale x-voudige inductie van de controle met het oplosmiddel van de referentiestandaard ten opzichte van de hoogste concentratie tamoxifen.	2,5
11	Relatieve inductie (%) PC	< 70 %
12	Relatieve inductie (%) NC	> 85 %

PC: positieve controle; NC: negatieve controle; VC: vehiculumcontrole (oplosmiddelcontrole zonder vaste concentratie van de agonistische referentiestandaard); SC: controle met het oplosmiddel van de teststof; C0: controle met het oplosmiddel van de referentiestandaard; SD: standaarddeviatie; LDH: lactaatdehydrogenase

Oplosmiddel-/vehiculumcontrole, referentiestandaarden, positieve controles, negatieve controles

23. Voor de screeningstrun en de integrale testrun moeten dezelfde oplosmiddel-/ vehiculumcontrole, referentiestandaarden, positieve controles en negatieve controles worden gebruikt. Bovendien moet de concentratie van de referentiestandaarden, positieve controles en negatieve controles gelijk zijn.

Oplosmiddelcontrole

24. Het oplosmiddel dat wordt gebruikt voor het oplossen van de teststoffen moet worden getest als oplosmiddelcontrole. Tijdens de validatie van de ER α CALUX-bioassay werd dimethylsulfoxide (DMSO, 1 % (v/v); CAS RN 67-68-5) als vehiculum gebruikt. Als een ander oplosmiddel dan DMSO wordt gebruikt, moeten alle referentiestandaarden, controles en teststoffen in hetzelfde vehiculum worden getest. Er zij op gewezen dat de oplosmiddelcontrole voor antagonisme-onderzoeken een vaste concentratie van de agonistische referentiestandaard 17 β -oestradiol (bij benadering de EC₅₀-concentratie) bevat. Om het oplosmiddel voor antagonisme-onderzoeken te testen moet een vehiculumcontrole worden opgezet en getest.

Vehiculumcontrole (antagonisme)

25. Voor antagonismebepalingen wordt aan het testmedium een vaste concentratie van de agonistische referentiestandaard 17 β -oestradiol (bij benadering de EC₅₀-concentratie) toegevoegd. Om het oplosmiddel dat wordt gebruikt voor het oplossen van de teststoffen in een antagonismebepaling te testen, moet een testmedium zonder vaste concentratie van de agonistische referentiestandaard 17 β -oestradiol worden bereid. Deze controle wordt aangeduid als de vehiculumcontrole. Tijdens de validatie van de ER α CALUX-bioassay werd dimethylsulfoxide (DMSO, 1 % (v/v); CAS RN 67-68-5) als vehiculum gebruikt. Als een ander oplosmiddel dan DMSO wordt gebruikt, moeten alle referentiestandaarden, controles en teststoffen in hetzelfde vehiculum worden getest.

Referentienormen

26. De referentiestandaard voor de agonismebepaling is 17 β -oestradiol (tabel 1). De referentiestandaarden bestaan uit een verdunningsreeks van acht concentraties 17 β -oestradiol (1×10^{-13} , 3×10^{-13} , 1×10^{-12} , 3×10^{-12} , 6×10^{-12} , 1×10^{-11} , 3×10^{-11} , 1×10^{-10} M).
27. De referentiestandaard voor de antagonismebepaling is tamoxifen (tabel 2). De referentiestandaarden bestaan uit een verdunningsreeks van acht concentraties tamoxifen (3×10^{-9} , 1×10^{-8} , 3×10^{-8} , 1×10^{-7} , 3×10^{-7} , 1×10^{-6} , 3×10^{-6} , 1×10^{-5} M). Elke concentratie van de antagonistische referentiestandaard moet ge-co-incubeerd worden met een vaste concentratie van de agonistische referentiestandaard 17 β -oestradiol (3×10^{-12} M).

Positieve controle

28. De positieve controle voor agonisme-onderzoeken is 17 α -methyltestosteron (tabel 1).
29. De positieve controle voor antagonisme-onderzoeken is 4-hydroxytamoxifen (tabel 2). De antagonistische positieve controle moet ge-co-incubeerd worden met een vaste concentratie van de agonistische referentiestandaard 17 β -oestradiol (3×10^{-12} M).

Negatieve controle

30. De negatieve controle voor agonisme-onderzoeken is corticosteron (tabel 1).
31. De negatieve controle voor antagonisme-onderzoeken is resveratrol (tabel 2). De antagonistische negatieve controle moet ge-co-incubeerd worden met een vaste concentratie van de agonistische referentiestandaard 17 β -oestradiol (3×10^{-12} M).

Aantoning van de bekwaamheid van laboratoria (zie punt 14 en de tabellen 3 en 4 onder „COMPONENTEN VAN DE ER TA-BEPALING” van deze testmethode)

Vehiculum

32. Het oplosmiddel dat wordt gebruikt om de teststof op te lossen, moet de teststof volledig oplosbaar maken en moet mengbaar zijn met het celmedium. Geschikte oplosmiddelen zijn DMSO, water en ethanol (95 % tot 100 % zuiverheid). Bij gebruik van DMSO als oplosmiddel mag de maximale DMSO-concentratie tijdens de incubatie niet hoger zijn dan 1 % (v/v). Het oplosmiddel moet vóór gebruik getest worden op afwezigheid van cytotoxiciteit en interferentie met de prestaties van de bepaling.

Bereiding van de referentiestandaarden, positieve controles, negatieve controles en teststoffen

33. Referentiestandaarden, positieve controles, negatieve controles en teststoffen worden opgelost in 100 % DMSO (of een geschikt oplosmiddel). Vervolgens moeten in hetzelfde oplosmiddel passende (seriële) verdunningen worden bereid. Alvorens te worden opgelost moeten alle stoffen de gelegenheid krijgen om te equilibreren op kamertemperatuur. In de vers bereide stamoplossingen van de referentiestandaarden, positieve controles, negatieve controles en teststoffen mag geen neerslag of troebelheid zichtbaar zijn. Stamoplossingen van referentiestandaarden en controles mogen in bulk worden bereid. Stamoplossingen van teststoffen moeten voor elk experiment vers worden bereid. De eindverdunningen van de referentiestandaarden, positieve controles, negatieve controles en teststoffen moeten voor elk experiment vers worden bereid en binnen 24 uur na bereiding worden gebruikt.

Oplosbaarheid, cytotoxiciteit en bereikbepaling

34. De oplosbaarheid van de teststoffen in het gekozen oplosmiddel wordt bepaald tijdens de screeningstestrun. Er wordt een stamoplossing bereid met een maximale concentratie van 0,1 M. Als deze concentratie oplosbaarheidsproblemen vertoont, moeten stamoplossingen met lagere concentraties worden bereid totdat de teststoffen volledig oplosbaar zijn. Tijdens de screeningstestrun worden 1:10-verdunningsreeksen van de teststof getest. De maximale concentratie voor de agonisme- en antagonismebepalingen is 1 mM. Uit de screening wordt een passend, beperkt concentratiebereik voor de teststoffen afgeleid dat tijdens de integrale testruns moet worden getest. Voor de integrale testruns moeten de volgende verdunningen worden gebruikt: 1 x, 3 x, 10 x, 30 x, 100 x, 300 x, 1000 x en 3000 x.
35. Het testen op cytotoxiciteit is opgenomen in het protocol voor de agonisme- en de antagonismebepaling (11). Deze tests op cytotoxiciteit zijn zowel in de screeningstestrun als in de integrale testruns opgenomen. Bij de validering van de ER α CALUX-bioassay werd de cytotoxiciteit beoordeeld aan de hand van de lactaatdehydrogenase-lekkagetest (LDH-lekkagetest) in combinatie met kwalitatieve visuele inspectie van de cellen (zie aanhangsel 4.1) na blootstelling aan de teststoffen. Er mogen evenwel ook andere kwantitatieve methoden worden gebruikt ter bepaling van de cytotoxiciteit (bv. colorimetrische test op basis van tetrazol (MTT) of CALUX-cytotoxiciteitsbioassay). In het algemeen worden teststofconcentraties die de cellevensvatbaarheid met meer dan 20 % doen afnemen, als cytotoxisch beschouwd, zodat ze niet kunnen worden gebruikt bij de evaluatie van de gegevens. Wat betreft de LDH-lekkagetest wordt de concentratie van de teststof als cytotoxisch beschouwd wanneer het percentage LDH-lekkage hoger is dan 120 %.

Blootstelling aan de teststof en indeling van de testplaat

36. Nadat een confluent kweekfles met gekweekte cellen is behandeld met trypsine, worden de cellen in een concentratie van 1×10^5 cellen/ml geresuspendeerd in oestrogeenvrij testmedium. 100 μ l geresuspendeerde cellen wordt uitgeplaat in de binnenste putjes van een microtiterplaat met 96 putjes. De buitenste putjes worden gevuld met 200 μ l fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS) (zie de figuren 1 en 2). De uitgeplate cellen worden 24 uur gepre-incubeerd in een CO₂-incubator (5 % CO₂, 37 °C, 100 % vochtigheid).
37. Na de pre-incubatie worden de platen geïnspecteerd op zichtbare cytotoxiciteit (zie aanhangsel 4.1), verontreiniging en confluentie. Voor de bepaling worden alleen platen zonder zichtbare cytotoxiciteit of verontreiniging en met minimaal 85 % confluentie gebruikt. Uit de binnenste putjes wordt het medium zorgvuldig verwijderd en vervangen door 200 μ l oestrogeenvrij testmedium met een passende verdunningsreeks van referentiestandaarden, teststoffen, positieve controles, negatieve controles en oplosmiddelcontroles (tabel 5: agonisme-onderzoeken; tabel 6: antagonisme-onderzoeken). Alle referentiestandaarden, teststoffen, positieve controles, negatieve controles en oplosmiddelcontroles worden in drievoud getest. In figuur 1 wordt de indeling van de plaat voor de agonismebepaling weergegeven.

In figuur 2 wordt de indeling van de plaat voor de antagonismebepaling weergegeven. Voor screeningstests en integrale tests wordt dezelfde plaatindeling gebruikt. Voor antagonismebepalingen bevatten alle binnenste putjes behalve die voor de vehiculumcontrole (VC) ook een vaste concentratie van de agonistische referentiestandaard 17β -oestradiol (3×10^{-12} M). Er zij op gewezen dat aan elke plaat die de teststof bevat, de referentiestandaarden C8 en C4 moeten worden toegevoegd.

38. Nadat de cellen aan alle chemische stoffen zijn blootgesteld, worden de 96-putjesplaten nog eens 24 uur in een CO₂-incubator (5 % CO₂, 37 °C, 100 % vochtigheid) geïncubeerd.

Figuur 1

Indeling van de microtiterplaten met 96 putjes voor de screening en de beoordeling van agonistische effecten.

Plaat 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Volgende platen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC ₅₀)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC ₅₀)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC ₅₀)	
H												

C0 = oplosmiddel van de referentiestandaard.

C(1-8) = verdunningsreeks (1-8, lage tot hoge concentraties) van de referentiestandaard.

PC = positieve controle.

NC = negatieve controle.

TCx-(1-8) = verdunningen (1-8, lage tot hoge concentraties) van de teststof voor de screeningstestrun en de beoordeling van de agonistische effecten van de teststof x.

SC = controle met het oplosmiddel van de teststof (bij voorkeur hetzelfde oplosmiddel als in C0, maar eventueel van een andere batch).

Grijze cellen: = Buitenste putjes, gevuld met 200 µl PBS.

Figuur 2

Indeling van de microtiterplaten met 96 putjes voor de screening en de beoordeling van antagonistische effecten.

Plaat 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Volgende platen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC ₅₀)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC ₅₀)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC ₅₀)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = oplosmiddel van de referentiestandaard.

C(1-8) = verdunningsreeks (1-8, lage tot hoge concentraties) van de referentiestandaard.

NC = negatieve controle.

PC = positieve controle.

TCx-(1-8) = verdunningen (1-8, lage tot hoge concentraties) van de teststof voor de screeningstrun en de beoordeling van de agonistische effecten van de teststof x.

SC = controle met het oplosmiddel van de teststof (bij voorkeur hetzelfde oplosmiddel als in C0, maar eventueel van een andere batch).

VC = vehiculumcontrole (oplosmiddelcontrole zonder vaste concentratie van de agonistische referentiestandaard 17β-oestradiol).

Grijze cellen: = Buitenste putjes, gevuld met 200 µl PBS.

Opmerking: alle binnenste putjes, behalve die voor de vehiculumcontrole (VC), bevatten ook een vaste concentratie van de agonistische referentiestandaard 17β-oestradiol ($3,0 \times 10^{-12}$ M).

Meting van de luminescentie

39. Het meten van de luminescentie wordt uitvoerig beschreven in het protocol voor de agonisme- en antagonismebeoordeling (10). Het medium moet uit de putjes worden verwijderd en de cellen moet worden gelyseerd na 24 uur incubatie om de celmembranen te openen en meting van de luciferaseactiviteit mogelijk te maken.
40. Voor de procedure voor het meten van de luminescentie is een luminometer nodig met 2 injectoren. De luciferase-reactie wordt gestart door het substraat luciferine te injecteren. De reactie wordt gestopt door 0,2 M NaOH toe te voegen. De reactie wordt gestopt om te voorkomen dat de luminescentie van het ene putje op het andere overgaat.
41. De lichtemissie uit elk putje wordt uitgedrukt als relatieve lichteenheden (RLU) per putje.

Screeningstestrun

42. De analyseresultaten van de screening worden gebruikt om een beperkt concentratiebereik van de teststoffen vast te stellen voor de integrale tests. Hoe de analyseresultaten van de screening worden beoordeeld en hoe het beperkte concentratiebereik voor de integrale tests wordt bepaald, wordt uitvoerig beschreven in het protocol voor de agonisme- en antagonismebeoordeling (10). Hier wordt een beknopte samenvatting gegeven van de procedures voor het bepalen van het concentratiebereik van de teststoffen voor de agonisme- en antagonismebeoordeling. Zie de tabellen 5 en 6 voor richtsnoeren voor het vaststellen van de verdunningsreeksen.

Selectie van de concentraties voor de beoordeling van agonistische effecten

43. In de screeningstestrun moeten de teststoffen worden getest in een verdunningsreeksen zoals aangegeven in tabel 5 (agonisme) en tabel 6 (antagonisme). Alle concentraties worden in drievoudige putjes getest volgens de plaatindeling die wordt weergegeven in figuur 1 (agonisme) of 2 (antagonisme).
44. Alleen analyseresultaten die aan de aanvaardbaarheidscriteria (tabel 3) voldoen, worden als valide beschouwd en mogen worden gebruikt om de respons van de teststoffen te beoordelen. Als een of meer microtiterplaten in een analyseserie niet aan de aanvaardbaarheidscriteria voldoen, moeten de betreffende microtiterplaten opnieuw worden geanalyseerd. Indien de eerste plaat met de volledige verdunningsreeks van de referentiestandaard niet aan de aanvaardbaarheidscriteria voldoet, moet de volledige testreeks (6 platen) opnieuw worden geanalyseerd.
45. De initiële concentratiebereiken van de teststoffen moeten worden aangepast en de screeningstest moet worden herhaald indien:
 - er cytotoxiciteit wordt waargenomen. De screeningsprocedure moet worden herhaald met lagere, niet-cytotoxische concentraties van de teststof;
 - de screening van de teststof geen volledige dosis-responscurve oplevert, omdat de geteste concentraties maximale inductie vertonen. De screeningstestrun moet worden herhaald met lagere concentraties van de teststof.
46. Wanneer er een valide verband tussen dosis en respons wordt waargenomen, moet de (laagste) concentratie worden geselecteerd waarbij maximale inductie wordt waargenomen en die geen cytotoxiciteit vertoont. De hoogste concentratie van de teststof die in de integrale testruns getest wordt, moet driemaal zo hoog zijn als deze geselecteerde concentratie.
47. Beginnend met de hoogste concentratie zoals hierboven vastgesteld wordt er een volledige, beperkte verdunningsreeks van de teststof bereid met verdunningsstappen zoals aangegeven in tabel 5.
48. Een teststof die geen enkel agonistisch effect vertoont, moet in de integrale testruns worden getest vanaf de hoogste, niet-cytotoxische concentratie die in de screening werd vastgesteld.

Selectie van de concentraties voor de beoordeling van antagonistische effecten

49. Alleen analyseresultaten die aan de aanvaardbaarheidscriteria (tabel 4) voldoen, worden als valide beschouwd en mogen worden gebruikt om de respons van de teststoffen te beoordelen. Als een of meer microtiterplaten in een analyseserie niet aan de aanvaardbaarheidscriteria voldoen, moeten de betreffende microtiterplaten opnieuw worden geanalyseerd. Indien de eerste plaat met de volledige verdunningsreeks van de referentiestandaard niet aan de aanvaardbaarheidscriteria voldoet, moet de volledige testreeks (6 platen) opnieuw worden geanalyseerd.
50. De initiële concentratiebereiken van de teststoffen moeten worden aangepast en de screeningstest moet worden herhaald indien:
- er cytotoxiciteit wordt waargenomen. De screeningsprocedure moet worden herhaald met lagere, niet-cytotoxische concentraties van de teststof;
 - de screening van de teststof geen volledige dosis-responscurve oplevert, omdat de geteste concentraties maximale remming vertonen. De screening moet worden herhaald met lagere concentraties van de teststof.
51. Wanneer er een valide verband tussen dosis en respons wordt gevonden, moet de (laagste) concentratie worden geselecteerd waarbij maximale remming wordt waargenomen en die geen cytotoxiciteit vertoont. De hoogste concentratie van de teststof die in de integrale testruns getest wordt, moet driemaal zo hoog zijn als deze geselecteerde concentratie.
52. Beginnend met de hoogste concentratie zoals hierboven vastgesteld wordt er een volledige, beperkte verdunningsreeks van de teststof bereid met verdunningsstappen zoals aangegeven in tabel 6.
53. Teststoffen die geen enkel antagonistisch effect vertonen, moeten in de integrale testruns worden getest vanaf de hoogste, niet-cytotoxische concentratie die in de screening werd vastgesteld.

Integrale testruns

54. Wanneer de beperkte concentratiebereiken zijn geselecteerd, moeten de teststoffen integraal worden getest in een verdunningsreeks zoals aangegeven in tabel 5 (agonisme) en tabel 6 (antagonisme). Alle concentraties worden in drievoudige putjes getest volgens de plaatindeling die wordt weergegeven in figuur 1 (agonisme) of 2 (antagonisme).
55. Alleen analyseresultaten die aan de aanvaardbaarheidscriteria (tabellen 3 en 4) voldoen, worden als valide beschouwd en mogen worden gebruikt om de respons van de teststoffen te beoordelen. Als een of meer microtiterplaten in een analyseserie niet aan de aanvaardbaarheidscriteria voldoen, moeten de betreffende microtiterplaten opnieuw worden geanalyseerd. Indien de eerste plaat met de volledige verdunningsreeks van de referentiestandaard niet aan de aanvaardbaarheidscriteria voldoet, moet de volledige testreeks (6 platen) opnieuw worden geanalyseerd.

Tabel 5

Concentraties en verdunningen van de referentiestandaarden, controles en teststoffen voor agonisiebepalingen

Referentie 17 β -oestradiol		TCx - verdunning screeningstest		TCx - verdunning integrale test		Controles	
conc. (M)						conc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	3×10^{-6}
C1	1×10^{-13}	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	1×10^{-8}
C2	3×10^{-13}	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	1×10^{-12}	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	3×10^{-12}	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	6×10^{-12}	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	1×10^{-11}	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	3×10^{-11}	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	1×10^{-10}						

TCx - teststof x

PC - positieve controle (17 α -methyltestosteron)

NC - negatieve controle (corticosteron)

C0 - controle met het oplosmiddel van de referentiestandaard

SC - controle met het oplosmiddel van de teststof

Tabel 6

Concentraties en verdunningen van de referentiestandaarden, controles en teststoffen voor antagonisiebepalingen

Referentie tamoxifen		TCx - verdunning screeningstest		TCx - verdunning integrale test		Controles	
conc. (M)						conc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	1×10^{-9}
C1	3×10^{-9}	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	1×10^{-5}
C2	1×10^{-8}	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	3×10^{-8}	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	1×10^{-7}	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	3×10^{-7}	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	Toegevoegde agonist	
C6	1×10^{-6}	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	conc. (M)	
C7	3×10^{-6}	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17 β -oestradiol	$3,0 \times 10^{-12}$
C8	1×10^{-5}						

TCx -teststof x

PC - positieve controle (4-hydroxytamoxifen)

NC - negatieve controle (resveratrol)

C0 - controle met het oplosmiddel van de referentiestandaard

SC - controle met het oplosmiddel van de teststof

VC - vehiculumcontrole (zonder vaste concentratie van de agonistische referentiestandaard 17 β -oestradiol ($3,0 \times 10^{-12}$ M))

Verzameling en analyse van de gegevens

56. Na de screeningstestrans en de integrale testruns moeten voor een agonismebepaling de EC₁₀, EC₅₀, PC₁₀, PC₅₀ en de maximale inductie (TCx_{max}) van een teststof worden vastgesteld. Voor een antagonismebepaling moeten de IC₂₀, IC₅₀, PC₈₀, PC₅₀ en minimale inductie (TCx_{min}) worden berekend. Figuur 3 (agonisme) en figuur 4 (antagonisme) bevatten een grafische weergave van deze parameters. De benodigde parameters worden berekend op basis van de relatieve inductie van elke teststof (ten opzichte van de maximale inductie van de referentiestandaard (=100 %)). De gegevens moeten worden beoordeeld aan de hand van een niet-lineaire regressie (variabele helling, 4 parameters) volgens onderstaande vergelijking:

$$Y = \text{Basis} + \frac{(\text{Top} - \text{Basis})}{(1 + 10^{((\lg \text{EC}_{50} - X) \times \text{Hill-coëfficiënt}))}}$$

Waarbij:

X = logaritme van de dosis of concentratie

Y = respons (relatieve inductie (%))

Top = maximale inductie (%)

Basis = minimale inductie (%)

LogEC₅₀ = logaritme van de concentratie waarbij 50 % van de maximale respons wordt waargenomen

Hill-coëfficiënt = hellingfactor of Hill-curve

57. De ruwe gegevens van de luminometer, uitgedrukt in relatieve lichteenheden (RLU), moeten worden overgezet in de spreadsheet voor gegevensanalyse die is opgezet voor de screeningstestrans en de integrale testruns. De ruwe gegevens moeten voldoen aan de aanvaardbaarheidscriteria in de tabellen 3A en 3B (agonisme) of 4A en 4B (antagonisme). Wanneer de ruwe gegevens aan de aanvaardbaarheidscriteria voldoen, worden de volgende berekeningen uitgevoerd om de benodigde parameters te bepalen:

Agonisme

- Trek de gemiddelde RLU van de controle met het oplosmiddel van de referentiestandaard af van elk van de ruwe analysegegevens van de referentiestandaarden.
- Trek de gemiddelde RLU van de controle met het oplosmiddel van de teststof af van elk van de ruwe analysegegevens van de teststoffen.

- Bereken de relatieve inductie voor elke concentratie van de referentiestandaard. Stel de inductie van de hoogste concentratie van de referentiestandaard op 100 %.

- Bereken de relatieve inductie van elke concentratie van de teststof, waarbij 100 % overeenkomt met de hoogste concentratie van de referentiestandaard.

- Beoordeel de analyseresultaten aan de hand van niet-lineaire regressie (variabele helling, 4 parameters).

- Bepaal de EC_{50} en de EC_{10} van de referentiestandaard.

- Bepaal de EC_{50} en de EC_{10} van de teststoffen.

- Bepaal de maximale relatieve inductie van de teststof (TC_{max}).

- Bepaal de PC_{10} en de PC_{50} van de teststoffen.

Als gevolg van bv. cytotoxiciteit of oplosbaarheidsproblemen is het niet altijd mogelijk om een volledige dosis-responscurve voor teststoffen te verkrijgen. De EC_{50} , EC_{10} en PC_{50} kunnen dan niet worden bepaald. In dat geval kunnen alleen de PC_{10} en de TC_{max} worden bepaald.

Antagonisme

- Trek de gemiddelde RLU van de hoogste concentratie van de referentiestandaard af van elk van de ruwe analysegegevens van de referentiestandaarden.

- Trek de gemiddelde RLU van de hoogste concentratie van de referentiestandaard af van elk van de ruwe analysegegevens van de teststoffen.

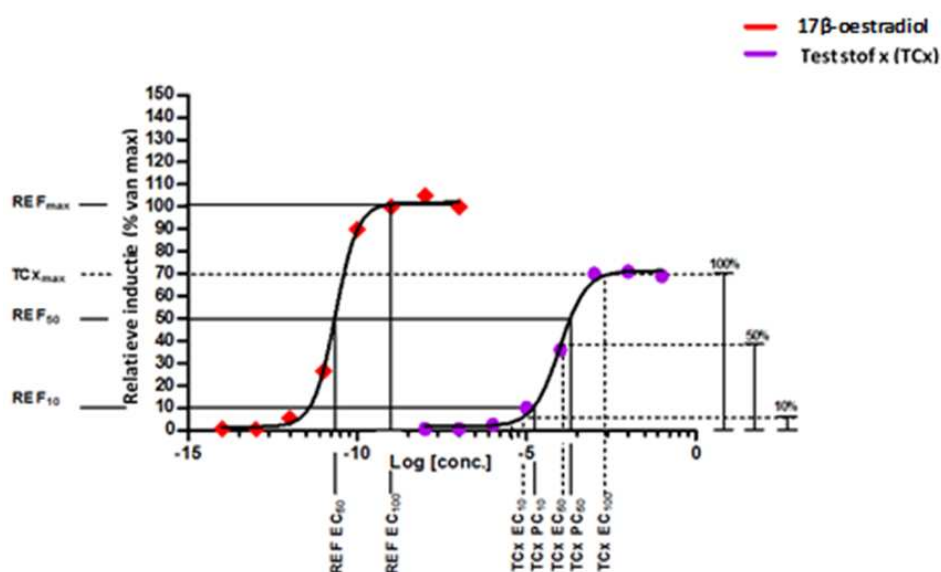
- Bereken de relatieve inductie voor elke concentratie van de referentiestandaard. Stel de inductie van de laagste concentratie van de referentiestandaard op 100 %.

- Bereken de relatieve inductie van elke concentratie van de teststof, waarbij 100 % overeenkomt met de laagste concentratie van de referentiestandaard.

- Beoordeel de analyseresultaten aan de hand van niet-lineaire regressie (variabele helling, 4 parameters).
- Bepaal de IC_{50} en de IC_{20} van de referentiestandaard.
- Bepaal de IC_{50} en de IC_{20} van de teststoffen.
- Bepaal de minimale relatieve inductie van de teststof (TC_{min}).
- Bepaal de PC_{80} en de PC_{50} van de teststoffen.

Figuur 3

Overzicht van de parameters die worden bepaald in de agonismebepaling



EC_{10} = concentratie van een stof waarbij 10 % van de maximale respons van de stof wordt waargenomen.

EC_{50} = concentratie van een stof waarbij 50 % van de maximale respons van de stof wordt waargenomen.

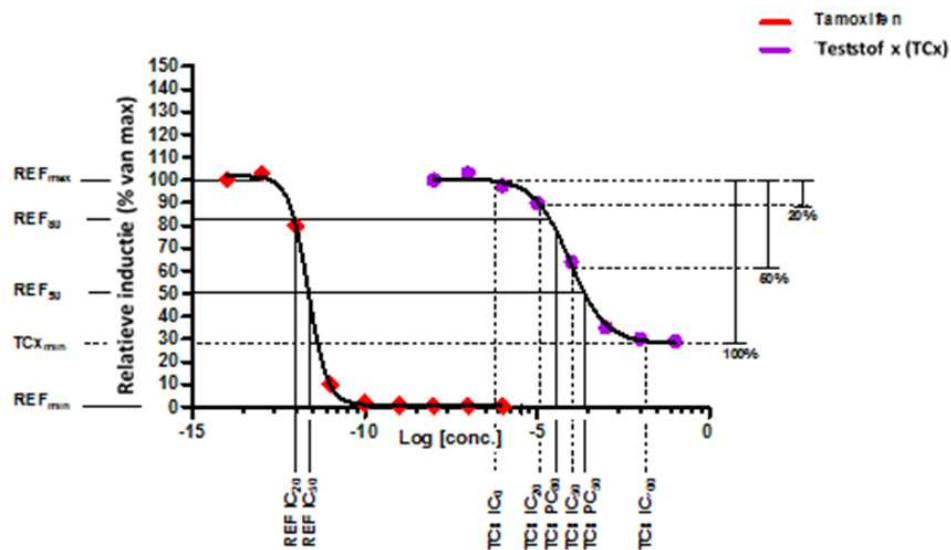
PC_{10} = concentratie van de teststof waarbij de respons gelijk is aan de EC_{10} van de referentiestandaard.

PC_{50} = concentratie van de teststof waarbij de respons gelijk is aan de EC_{50} van de referentiestandaard.

$TC_{x_{max}}$ = maximale relatieve inductie van de teststof.

Figuur 4

Overzicht van de parameters die worden bepaald in de antagonismebepaling



IC₂₀ = concentratie van een stof waarbij 80 % van de maximale respons van de stof wordt waargenomen (20 % remming).

IC₅₀ = concentratie van een stof waarbij 50 % van de maximale respons van de stof wordt waargenomen (50 % remming).

PC₈₀ = concentratie van de teststof waarbij de respons gelijk is aan de IC₂₀ van de referentiestandaard.

PC₅₀ = concentratie van de teststof waarbij de respons gelijk is aan de IC₅₀ van de referentiestandaard.

TCX_{min} = minimale relatieve inductie van de teststof.

Als gevolg van bv. cytotoxiciteit of oplosbaarheidsproblemen is het niet altijd mogelijk om een volledige dosis-responscurve voor teststoffen te verkrijgen. De IC₅₀, IC₂₀ en PC₅₀ kunnen dan niet worden bepaald. In dat geval kunnen alleen de PC₂₀ en de TC_{min} worden bepaald.

58. De resultaten moeten op twee (of drie) onafhankelijke testruns worden gebaseerd. Als twee testruns vergelijkbare en dus reproduceerbare resultaten opleveren, is het niet nodig een derde testrun uit te voeren. Om aanvaardbaar te zijn moeten de resultaten:

— aan de aanvaardbaarheidscriteria voldoen (zie Aanvaardbaarheidscriteria, punten 14-22);

— reproduceerbaar zijn.

Criteria voor gegevensinterpretatie

59. Voor de interpretatie van de gegevens en de beslissing of een teststof als positief of negatief moet worden beschouwd, worden de volgende criteria gehanteerd:

Agonisme

Voor elke integrale testrun wordt een teststof als **positief** beschouwd indien:

- 1 de TC_{max} gelijk is aan of hoger is dan 10 % van de maximale respons van de referentiestandaard (REF_{10});
- 2 ten minste 2 opeenvolgende concentraties van de teststof gelijk zijn aan of hoger zijn dan de REF_{10} .

Voor elke integrale testrun wordt een teststof als **negatief** beschouwd indien:

- 1 de TC_{max} niet hoger is dan 10 % van de maximale respons van de referentiestandaard (REF_{10});
- 2 minder dan 2 concentraties van de teststof gelijk zijn aan of hoger zijn dan de REF_{10} .

Antagonisme

Voor elke integrale testrun wordt een teststof als **positief** beschouwd indien:

- 1 de TC_{min} gelijk is aan of lager is dan 80 % van de maximale respons van de referentiestandaard ($REF_{80} = 20\%$ remming);
- 2 ten minste 2 opeenvolgende concentraties van de teststof gelijk zijn aan of lager zijn dan de REF_{80} .

Voor elke integrale testrun wordt een teststof als **negatief** beschouwd indien:

- 1 de TC_{min} hoger is dan 80 % van de maximale respons van de referentiestandaard ($REF_{80} = 20\%$ remming);
- 2 minder dan 2 concentraties van de teststof gelijk zijn aan of lager zijn dan de REF_{80} .

60. Ter karakterisering van de potentie van de positieve respons van een teststof moeten de sterkte van het effect (agonisme: TC_{max} ; antagonisme: TC_{min}) en de concentratie waarbij het effect zich voordoet (agonisme: EC_{10} , EC_{50} , PC_{10} , PC_{50} ; antagonisme: IC_{20} , IC_{50} , PC_{80} , PC_{50}) in het verslag worden opgenomen.

TESTVERSLAG

61. Zie punt 20 van „COMPONENTEN VAN DE ER TA-BEPALING”.

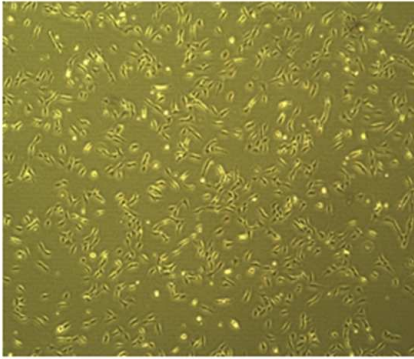
LITERATUUR

- (1) OESO (2016). Draft Validation report of the (anti-) ER α CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.
- (2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136-148.
- (3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, and van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER) α and not through ER β . *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.
- (4) Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, *Chemistry and Biology*17(6):646-57.
- (5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavailès V and Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459-1469.
- (6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.*, 139, 4252-4263.
- (7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 122, 204–211.

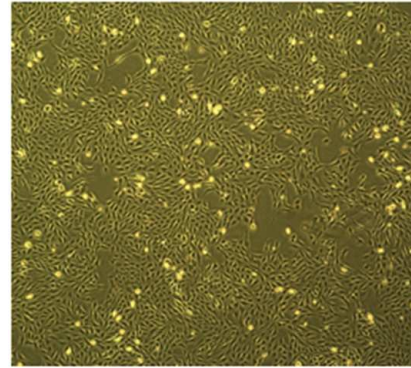
- (8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, and van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.*, 89(1), 173–187.
- (9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M and Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769-771.
- (10) Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Scr.*, 4, 67-73
- (11) Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ER α CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, Nederland.

Aanhangsel 4.1:

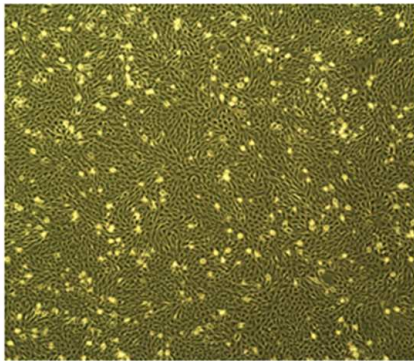
VISUELE INSPECTIE OP CELLEVENSVATBAARHEID



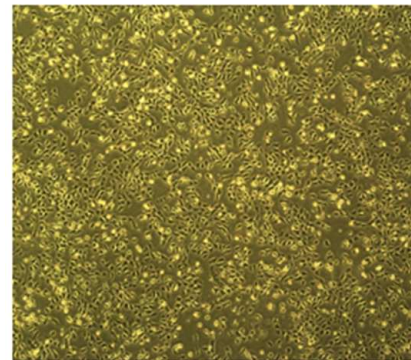
< 5 % confluente. Cellen zijn pas geënt. 100 % cellevensvatbaarheid. Classificatie: „geen cytotoxiciteit”



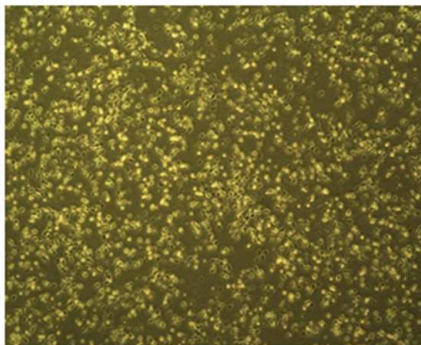
> 85 % confluente. In dit stadium worden de cellen aan de teststoffen blootgesteld. > 95 % cellevensvatbaarheid. Classificatie: „geen cytotoxiciteit”



> 95 % confluente. Cellen zijn dicht oengepakt en beginnen elkaar te overgroeien. > 95 % cellevensvatbaarheid. Classificatie: „geen cytotoxiciteit”



< 25 % cellevensvatbaarheid. Cellen raken los van elkaar, het contact tussen de cellen neemt af. Cellen zijn rond van vorm. Classificatie: „cytotoxiciteit”



< 5 % cellevensvatbaarheid. Cellen zijn helemaal los van elkaar en het contact tussen de cellen is verbroken. Cellen zijn rond van vorm. Classificatie: „cytotoxiciteit”

B.67. IN-VITROGENMUTATIE TESTS MET ZOOGDIERCELLEN AAN DE HAND VAN HET GEN VOOR THYMINDEKINASE

INLEIDING

1. Deze testmethode (TM) is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 490 (2016) van de OESO. Testmethoden worden periodiek herzien in het licht van de wetenschappelijke vooruitgang, regelgevingsbehoeften en dierenwelzijn. De muizenlymfoombepaling (mouse lymphoma assay, MLA) en de TK6-test met de locus van thymidinekinase (TK) maakten oorspronkelijk deel uit van testmethode B.17. Sindsdien heeft de MLA-deskundigenwerkgroep van de International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT) internationaal geharmoniseerde aanbevelingen opgesteld voor aanvaardbaarheidscriteria en gegevensinterpretatie voor de MLA (1) (2) (3) (4) (5). Deze aanbevelingen worden verwerkt in deze nieuwe testmethode B.67. Deze testmethode is opgesteld voor de MLA, alsmede voor de TK6-test, omdat die ook gebruikmaakt van de TK-locus. Terwijl de MLA algemeen is gebruikt met het oog op regelgeving, is de TK6 vooralsnog veel minder toegepast. Er zij op gewezen dat de beide cellijnen ondanks de vergelijkbare eindpunten niet inwisselbaar zijn en dat regelgevingsprogramma's voor een bepaald regelgevingsdoel een gegronde voorkeur kunnen geven aan de ene boven de andere. Zo is bij de validering van de MLA aangetoond dat deze bepaling niet alleen geschikt is voor het detecteren van genmutaties, maar ook van het vermogen van een teststof om structurele chromosoombeschadigingen teweeg te brengen. Deze testmethode maakt deel uit van een reeks methoden om de genotoxiciteit te testen. De OESO heeft een document opgesteld met beknopte informatie over genetisch-toxicologische tests en een overzicht van de recente wijzigingen van de OESO-testrichtlijnen voor genetische toxiciteit (6).
2. De in-vitrogenmutatietests met zoogdiercellen zijn bedoeld voor de detectie van genmutaties die door chemische stoffen zijn geïnduceerd. In de cellijnen die in deze tests worden gebruikt, worden voorwaartse mutaties gemeten in reporter genen, met name het endogene gen voor thymidinekinase (*TK* in menselijke cellen en *Tk* in knaagdiercellen, in deze testmethode samen aangeduid als *TK*). Deze testmethode is bedoeld voor gebruik met twee cellijnen: de muizenlymfoomcellijn L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C (algemeen aangeduid als L5178Y) en de humane lymfoblastoidcellijn TK6 (algemeen aangeduid als TK6). Hoewel de beide cellijnen verschillen in herkomst, celgroei, p53-status enz. kunnen de *TK*-genmutatietests met beide celtypen op vergelijkbare wijze worden uitgevoerd, zoals beschreven in deze testmethode.
3. Omdat het thymidinekinasegen een autosomaal, heterozygoot gen is, is het mogelijk om levensvatbare kolonies te detecteren waarvan de cellen deficiënt zijn in het enzym thymidinekinase na mutatie van $TK^{+/-}$ naar $TK^{-/-}$. Deze deficiëntie kan het gevolg zijn van genetische gebeurtenissen die effect hebben op het *TK*-gen, waaronder genmutaties (puntmutaties, leesraammutaties, kleine deleties enz.) en chromosomale gebeurtenissen (grote deleties, chromosoomherschikkingen en mitotische recombinatie). Laatstgenoemde gebeurtenissen komen tot uiting als verlies van heterozygositeit, wat een vaak voorkomende genetische verandering is van tumorsuppressorgenen in de menselijke tumorigenese. Verlies van het volledige chromosoom waarop zich het *TK*-gen bevindt, als gevolg van verstoring van de spoelvorming en/of mitotische non-disjunctie, kan in theorie worden gedetecteerd in de MLA. Een combinatie van cytogene en moleculaire analyse laat inderdaad duidelijk zien dat bepaalde *TK*-mutanten in de MLA uit non-disjunctie voortkomen. De bewijskracht wijst evenwel uit dat *TK*-genmutatietests niet betrouwbaar zijn voor het detecteren van aneugenen wanneer de standaard cytotoxiciteitscriteria (zoals beschreven in deze testmethode) worden toegepast, en dat deze tests daarom niet geschikt zijn voor het detecteren van aneugenen(7) (8) (9).
4. In *TK*-genmutatietests worden twee onderscheiden fenotypen van *TK*-mutanten gegenereerd; normaal groeiende mutanten, die even snel groeien als heterozygote *TK*-cellen, en langzaam groeiende mutanten die groeien met langere verdubbelingstijden. Normaal groeiende en langzaam groeiende mutanten zijn herkenbaar als respectievelijk grote en kleine mutantkolonies in de MLA en vroeg verschijnende en laat verschijnende mutantkolonies in de TK6. Er is een gedetailleerde analyse gemaakt van de moleculaire en cytogenetische aard van zowel grote als kleine MLA-mutantkolonies (8) (10) (11) (12) (13). De moleculaire en cytogenetische aard van de vroeg verschijnende en laat verschijnende TK6-mutanten zijn eveneens uitvoerig onderzocht (14) (15) (16) (17). Langzaam groeiende mutanten voor beide celtypen hebben genetische beschadigingen opgelopen aan een of meer verondersteld groei-regulerende genen dichtbij de *TK*-locus, wat leidt tot langere verdubbelingstijden en de vorming van laat verschijnende of kleine kolonies (18). Er is een verband gelegd tussen langzaam groeiende mutanten en chemische stoffen die grootschalige structurele veranderingen op chromosoomniveau induceren. Cellen waarvan de beschadigingen geen invloed hebben op het/de verondersteld groei-regulerende gen(en) dichtbij de *TK*-locus, groeien in vergelijkbaar tempo als de oudercellen en worden normaal groeiende mutanten. De inductie van voornamelijk normaal groeiende mutanten wordt in verband gebracht met chemische stoffen die voornamelijk als puntmutagenen optreden. Het is dan ook essentieel om zowel langzaam groeiende als normaal groeiende mutanten te tellen, teneinde alle mutanten in aanmerking te nemen en enig inzicht te krijgen in het/de type(n) door de teststof veroorzaakte schade (mutagenen vs. clastogenen) (10) (12) (18) (19).

5. De testmethode is zodanig opgezet dat deze algemene informatie verschaft die zowel voor de MLA als voor de TK6 geldt, evenals gespecialiseerde richtsnoeren voor de afzonderlijke tests.
6. Gebruikte definities worden gegeven in aanhangsel 1.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

7. Bij in vitro uitgevoerde tests moet er meestal een exogene metabole activeringsbron worden gebruikt. Het exogene metabole activeringssysteem kan de omstandigheden in vivo niet volledig nabootsen.
8. Er moet goed op worden gelet dat omstandigheden die zouden kunnen leiden tot artefactuele positieve resultaten (d.w.z. mogelijke interactie met het testsysteem), die niet het gevolg zijn van interactie tussen de teststof en het genetische materiaal van de cel, worden vermeden; zulke omstandigheden zijn onder andere veranderingen in de pH of de osmolaliteit, interactie met de bestanddelen van het medium (20) (21) of een te sterke cytotoxiciteit (22) (23) (24). Als de cytotoxiciteit de maximaal aanbevolen cytotoxiciteitsniveaus zoals omschreven in punt 28 overschrijdt, wordt deze als te sterk beschouwd voor de MLA en de TK6. Bovendien zij erop gewezen dat teststoffen die thymidine-analogen zijn of zich als thymidine-analogen gedragen, de mutantfrequentie kunnen verhogen door selectieve groei van de spontane achtergrondmutanten tijdens de behandeling van de cellen en dat het voor een adequate beoordeling van dergelijke stoffen nodig kan zijn om aanvullende testmethoden toe te passen (25).
9. Voor gefabriceerde nanomaterialen kunnen specifieke aanpassingen van deze testmethode noodzakelijk zijn, maar deze worden in deze testmethode niet beschreven.
10. Voordat de testmethode wordt gebruikt voor het testen van een mengsel om gegevens te genereren voor een beoogd regelgevingsdoel, moet worden nagegaan of, en zo ja, waarom deze methode betrouwbare resultaten oplevert voor dat doel. Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is.
11. Mutantcellen met een deficiëntie aan thymidinekinase-enzymactiviteit als gevolg van de mutatie van $TK^{+/-}$ naar $TK^{-/-}$ zijn resistent voor de cytostatische effecten van de pyrimidine-analoog trifluorthymidine (TFT). Cellen zonder deficiëntie aan TK zijn gevoelig voor TFT, waardoor het celmetabolisme wordt geremd en er geen celdeling meer plaatsvindt. Dit betekent dat mutantcellen zich in aanwezigheid van TFT wel kunnen voortplanten en zichtbare kolonies kunnen vormen, en cellen die het TK-enzym bevatten, niet.

PRINCIPE VAN DE TEST

12. Cellen in suspensie worden zowel met als zonder een exogene metabole activeringsbron (zie punt 19) gedurende een geschikte periode (zie punt 33) aan de teststof blootgesteld en vervolgens overgeënt om de cytotoxiciteit te bepalen en fenotypische expressie mogelijk te maken alvorens de mutanten te selecteren. Voor de MLA wordt de cytotoxiciteit bepaald aan de hand van de relatieve totale groei (RTG – zie punt 25), voor de TK6 aan de hand van de relatieve overleving (relative survival, RS – zie punt 26). De behandelde culturen blijven een voldoende lange periode, kenmerkend voor elk celtype (zie punt 37), in groeimedium om een vrijwel optimale fenotypische expressie van de geïnduceerde mutaties mogelijk te maken. Na fenotypische expressie wordt de mutantfrequentie bepaald door bekende aantallen cellen te enten in medium met de selecterende stof voor de detectie van mutantkolonies en in medium zonder de selecterende stof voor de bepaling van de kloneringsefficiëntie (levensvatbaarheid). Na een geschikte incubatietijd worden de kolonies geteld. De mutantfrequentie wordt bepaald aan de hand van het aantal mutantkolonies, gecorrigeerd voor de kloneringsefficiëntie op het moment van selecteren van de mutanten.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Vorbereidingen

Cellen

13. Voor de MLA: Voor de MLA moet de $TK^{+/-}$ -3.7.2C sublijn van L5178Y-cellen worden gebruikt omdat deze specifieke sublijn ook is gebruikt bij de ontwikkeling en karakterisering van de MLA. De cellijn L5178Y is afgeleid van een door methylcholantreen geïnduceerd thymuslymfoom van een DBA-2-muis (26). Clive *et al.* behandelden L5178Y-cellen (door Clive $TK^{+/+}$ -3 genoemd) met ethylmethaansulfonaat en isoleerden een $TK^{-/-}$ -kloon ($TK^{-/-}$ -3.7 genoemd) met broomdeoxyuridine als selecterende stof. Van de $TK^{-/-}$ -kloon werden een spontane $TK^{+/-}$ -kloon ($TK^{+/-}$ -3.7.2. genoemd) en een subkloon ($TK^{+/-}$ -3.7.2C genoemd) geïsoleerd en gekarakteriseerd voor gebruik in de MLA (27). Het karyotype voor de cellijn is gepubliceerd (28) (29) (30) (31). Het modale aantal chromosomen is 40. Er is één metacentrisch chromosoom (t12 13) dat als één chromosoom moet worden geteld. Bij de muis is de locus van TK gelegen op het distale uiteinde van chromosoom 11. De cellijn L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C heeft mutaties in

beide p53-allelen en produceert mutant-p53 eiwit (32) (33). Het is waarschijnlijk aan de p53-status van de cellijn TK^{+/-} -3.7.2C te danken dat de test grootschalige schade kan detecteren (17).

14. Voor de TK6: TK6 is een humane lymfoblastoidcellijn. De oudercellijn is een door het Epstein-Barr-virus getransformeerde cellijn, WI-L2, die oorspronkelijk afkomstig is van een mannelijke 5-jarige met hereditaire sferocytose. Door de eerste geïsoleerde kloon, HH4, te mutageniseren met ICR191 werd een TK-heterozygote cellijn, TK6, gegenereerd (34). TK6-cellen zijn bijna allemaal diploïde en het representatieve karyotype is 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Bij de mens is de locus van TK gelegen op de lange arm van chromosoom 17. TK6 is een p53-competente cellijn, omdat het een wildtype p53-sequentie heeft in beide allelen en alleen wildtype p53-eiwit tot expressie brengt (36).
15. Voor zowel de MLA als de TK6 wordt het testlaboratorium geadviseerd, wanneer het voor het eerst een mastervoorraad aanlegt of deze aanvult, zich ervan te vergewissen dat er geen sprake is van verontreiniging met *mycoplasma*, de cellen te karyotyperen of de chromosomen met de TK-locus te kleuren, en de populatieverdubbelingstijden te controleren. De normale tijd voor de celcyclus voor de in het testlaboratorium gebruikte cellen moet worden vastgesteld en moet overeenkomen met gepubliceerde celkenmerken (16) (19) (37). Deze mastervoorraad moet worden bewaard bij maximaal -150 °C en moet worden gebruikt voor de bereiding van alle werk-celvoorraden.
16. Hetzij voorafgaand aan de bereiding van een groot aantal gecryopreserveerde werkvoorraden, hetzij vlak voor gebruik in een experiment is het wellicht nodig reeds aanwezige mutantcellen uit de cultuur te verwijderen (tenzij de mutantfrequentie (MF) van de oplosmiddelcontrole al binnen het aanvaardbare bereik ligt – zie tabel 2 voor de MLA). Hiertoe wordt methotrexaat (*aminopterie*) gebruikt om TK-deficiënte cellen uit te selecteren en worden thymidine, hypoxanthine en glycine (L5178Y) of 2'-deoxycytidine (TK6) aan de cultuur toegevoegd om een optimale groei van de TK-competente cellen te waarborgen (19) (38) (39), en (40) voor TK6). Algemene adviezen voor goede praktijken om celculturen in leven te houden en speciale adviezen voor L5178Y- en TK6-cellen zijn te vinden in (19) (31) (37) (39) (41). Voor laboratoria die voorraden mastercellen nodig hebben om de MLA of de TK6 op te zetten of om nieuwe voorraden mastercellen te verkrijgen, is een celbank met goed gekarakteriseerde cellen beschikbaar (37).

Media en kweekomstandigheden

17. Voor beide tests moet er worden gezorgd voor geschikte kweekmedia en incubatieomstandigheden voor de culturen (bv. kweekvaten, vochtige atmosfeer van 5 % CO₂, incubatietemperatuur van 37 °C). De celculturen moeten altijd onder zodanige omstandigheden worden gehouden dat ze in log-fase groeien. Het is vooral belangrijk dat de medium- en kweekomstandigheden zodanig worden gekozen dat de celgroei tijdens de expressieperiode en de klonering van zowel de mutantcellen als de gewone cellen optimaal zijn. Voor de MLA en de TK6 is het ook van belang dat de kweekomstandigheden zorgen voor een optimale groei van TK-mutanten die grote kolonies vormen/vroeg verschijnen, als TK-mutanten die kleine kolonies vormen/laat verschijnen. Meer bijzonderheden over de kweek, waaronder de noodzaak om paardenserum goed te verwarmen om het te inactiveren indien bij de selectie van mutanten RPMI-medium wordt gebruikt, is te vinden in (19) (31) (38) (39) (40) (42).

Prepareren van de culturen

18. Cellen uit stamculturen worden met een zodanige dichtheid in een kweekmedium geënt dat de suspensieculturen tijdens de behandelingsperiode en de expressieperiode exponentieel zullen blijven groeien.

Metabole activering

19. Bij het gebruik van L5178Y- en TK6-cellen moeten exogene metabole activeringssystemen worden gehanteerd omdat ze onvoldoende endogene metabole capaciteit hebben. Het meest gebruikte systeem dat als standaard wordt aanbevolen, tenzij anders wordt gemotiveerd, is een post-mitochondriale fractie aangevuld met een cofactor (S9), verkregen uit de lever van knaagdieren (doorgaans ratten) die zijn behandeld met enzym-inducerende stoffen als Aroclor 1254 (43) (44) (45) of een combinatie van fenobarbiton en β -naftoflavon (46) (47) (48) (49) (50) (51). De laatste combinatie druist niet in tegen het Verdrag van Stockholm inzake persistente organische verontreinigende stoffen (52). Bovendien is aangetoond dat zij even effectief is als Aroclor 1254 voor de inducering van oxidasen met gemengde functie (45) (46) (47) (48) (49). De S9-fractie wordt meestal gebruikt bij een concentratie van

1-2 %, maar mag worden verhoogd tot 10 % (v/v) in het uiteindelijke testmedium. De keuze van het type en de concentratie van het exogene metabole activeringssysteem dat of de metabole inductor die wordt gebruikt, kan worden beïnvloed door de klasse van de teststoffen.

Teststofbereiding

20. Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen worden bereid en eventueel vóór de behandeling van de cellen worden verdund (zie punt 21). Vloeibare teststoffen kunnen direct aan het testsysteem worden toegevoegd en/of worden verdund vóór de behandeling van het testsysteem. Bij het testen van gassen of vluchtige teststoffen moeten geschikte aanpassingen van de standaardprotocollen worden gevolgd, zoals de behandeling in gesloten kweekvaten (53) (54) (55). Preparaten van de teststof moeten worden bereid vlak vóór de behandeling, tenzij met stabiliteitsgegevens is aangetoond dat bewaren van het preparaat aanvaardbaar is.

TESTOMSTANDIGHEDEN

Oplosmiddelen

21. Het oplosmiddel wordt zo gekozen dat het de oplosbaarheid van de te testen chemische stof vergroot zonder een negatieve invloed te hebben op het verloop van de test, bv. door veranderingen in de celgroei, aantasting van de integriteit van de teststof, reacties met kweekvaten, belemmering van het metabole activeringssysteem. Het wordt aanbevolen waar mogelijk eerst het gebruik van een waterig oplosmiddel (of kweekmedium) te overwegen. Gangbare oplosmiddelen zijn water of dimethylsulfoxide. Organische oplosmiddelen mogen in de regel de 1 % (v/v) en waterige oplosmiddelen (fysiologisch zout of water) de 10 % (v/v) in het uiteindelijke behandelingsmedium niet overschrijden. Als er andere dan de gangbare oplosmiddelen (bv. ethanol of aceton) worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze verenigbaar zijn met de teststoffen en het testsysteem en dat zij geen genetische toxiciteit vertonen in de gebruikte concentratie. Als die gegevens ontbreken, is het belangrijk ook onbehandelde controles toe te voegen (zie aanhangsel 1, Definities) om aan te tonen dat het gekozen oplosmiddel geen schadelijke of mutagene effecten induceert.

METING VAN CYTOTOXICITEIT EN KEUZE VAN BEHANDELINGSCONCENTRATIES

22. Bij de bepaling van de hoogste te testen concentratie van de teststof moeten concentraties worden vermeden die kunnen leiden tot artefactuele positieve reacties, zoals reacties die bovenmatige cytotoxiciteit (zie punt 28) voortbrengen, neerslag (zie punt 29) in het kweekmedium of uitgesproken wijzigingen in pH of osmolaliteit (zie punt 8). Indien de teststof op het ogenblik van toevoeging een uitgesproken wijziging in de pH van het medium veroorzaakt, kan de pH worden aangepast door het uiteindelijke behandelingsmedium te bufferen zodat artefactuele positieve reacties worden vermeden en passende kweekomstandigheden in stand worden gehouden.
23. De concentraties worden gekozen op basis van de cytotoxiciteit en andere overwegingen (zie punten 27-30). Hoewel de evaluatie van cytotoxiciteit in een eerste test nuttig kan zijn om de in het hoofdexperiment te gebruiken concentraties beter te kunnen vaststellen, is een eerste test niet vereist. Ook als er wel een voorevaluatie van cytotoxiciteit wordt uitgevoerd, moet in het hoofdexperiment nog steeds voor elke cultuur de cytotoxiciteit worden gemeten. Als er een bereikbepalingstest wordt uitgevoerd, moet deze een breed concentratiebereik bestrijken en kan deze hetzij worden beëindigd op dag 1 na de behandeling, of worden voortgezet tot en met de expressie op dag 2 en de selectie van de mutanten (als blijkt dat de gebruikte concentraties passend zijn).
24. Voor elke afzonderlijke testcultuur en controlecultuur moet de cytotoxiciteit worden vastgesteld: de te gebruiken methoden voor de MLA (2) en de TK6 (15) worden bepaald door de internationaal erkende praktijk.
25. Voor beide versies (agar en microtiterplaat) van de MLA: moet de cytotoxiciteit worden beoordeeld aan de hand van de relatieve totale groei (RTG), zoals oorspronkelijk gedefinieerd door Clive en Spector in 1975 (2). Deze maat voor de cytotoxiciteit omvat de relatieve suspensiegroei (RSG: testcultuur t.o.v. oplosmiddelcontrole) tijdens de behandeling van de cellen, de expressietijd en de relatieve kloneringsefficiëntie (RCE: testcultuur t.o.v. oplosmiddelcontrole) op het moment dat de mutanten worden geselecteerd (2). Er zij op gewezen dat in de RSG elk verlies van cellen in de testcultuur tijdens de behandeling in aanmerking wordt genomen (zie aanhangsel 2 voor de formules).

26. Voor de TK6: de cytotoxiciteit moet worden beoordeeld aan de hand van de relatieve overleving (RS), d.w.z. de kloneringsefficiëntie van onmiddellijk na de behandeling uitgeplate cellen, gecorrigeerd voor elk verlies van cellen gedurende de behandeling, op basis van het aantal cellen, vergeleken met de negatieve controle (waaraan een overleving van 100 % wordt toegekend) (zie aanhangsel 2 voor de formule).
27. Er moeten ten minste vier testconcentraties (exclusief het oplosmiddel en positieve controles) die voldoen aan de aanvaardbaarheidscriteria (passende mate van cytotoxiciteit, aantal cellen enz.), worden geëvalueerd. Hoewel het gebruik van duploculturen raadzaam is, kan bij elke geteste concentratie één behandelde cultuur worden gebruikt, maar ook duploculturen. De resultaten verkregen voor duploculturen bij een gegeven concentratie moeten afzonderlijk worden gerapporteerd, maar kunnen voor de gegevensanalyse worden gepoold (55). Voor teststoffen die weinig of geen cytotoxiciteit vertonen, zijn intervallen tussen de testconcentraties van ongeveer een factor 2 tot 3 doorgaans passend. Wanneer er cytotoxiciteit optreedt, moeten de concentraties een cytotoxiciteitsinterval bestrijken van een concentratie waarbij cytotoxiciteit optreedt zoals beschreven in punt 28, tot en met concentraties waarbij er matige en geen of vrijwel geen cytotoxiciteit is. Veel teststoffen vertonen een steile concentratie-responscurve, en om het hele cytotoxiciteitsbereik te bestrijken of in detail de concentratierespons te bestuderen zullen mogelijk dichter bij elkaar liggende concentraties en meer dan vier concentraties moeten worden gebruikt, in het bijzonder in situaties waarin een herhalingsexperiment vereist is (zie punt 70). Vooral bij gebruik van één cultuur kan het van belang zijn om meer dan vier concentraties te gebruiken.
28. Als de maximale concentratie is gebaseerd op cytotoxiciteit, moet voor de hoogste concentratie worden gestreefd naar een RTG tussen 20 en 10 % voor de MLA en een RS tussen 20 en 10 % voor de TK6 (punt 67).
29. Voor slecht oplosbare teststoffen die bij concentraties onder de oplosbaarheids grens niet cytotoxisch zijn, moet de hoogste geanalyseerde concentratie troebelheid of een met het oog of met behulp van een omgekeerde microscoop aan het eind van de behandeling met de teststof zichtbaar neerslag opleveren. Zelfs indien cytotoxiciteit optreedt boven de oplosbaarheids grens, is het raadzaam de test uit te voeren bij slechts één concentratie die troebelheid of een zichtbaar neerslag oplevert, omdat het neerslag kan leiden tot artefactuele effecten. Omdat voor de MLA en de TK6 suspensieculturen worden gebruikt, moet er zorgvuldig op worden toegezien dat het neerslag de uitvoering van de test niet verstoort. Ook kan het nuttig zijn om voorafgaand aan het experiment de oplosbaarheid in het kweekmedium te bepalen.
30. Indien er geen neerslag of beperkende cytotoxiciteit wordt waargenomen, moet de hoogste testconcentratie overeenkomen met de laagste van de volgende waarden: 10 mM, 2 mg/ml of 2 µl/ml (57) (58). Wanneer de samenstelling van de teststof niet vastgesteld is, bv. in geval van een stof van onbekende of variabele samenstelling, complexe reactieproducten of biologisch materiaal (d.w.z. Chemical Substances of Unknown or Variable Composition of UVCB's), milieu-extracten enz., moet de hoogste concentratie bij het ontbreken van voldoende cytotoxiciteit mogelijk hoger zijn (bv. 5 mg/ml) om de concentratie van elk van de componenten te verhogen. Er zij echter opgemerkt dat deze eisen voor geneesmiddelen voor menselijk gebruik anders kunnen zijn (59).

Controles

31. Voor elk experimentele omstandigheid dienen gelijktijdige negatieve controles (zie punt 21) in het experiment te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel wordt toegevoerd en die verder op dezelfde manier worden behandeld als de culturen met teststof.
32. Gelijktijdige positieve controles zijn nodig om aan te tonen dat het laboratorium in staat is om mutagenen te identificeren onder de omstandigheden van het gebruikte testprotocol, dat het exogene metabole activeringssysteem doeltreffend is (indien van toepassing) en dat zowel TK-mutanten die kleine kolonies vormen/laat verschijnen, als TK-mutanten die grote kolonies vormen/vroeg verschijnen adequaat gedetecteerd worden. Voorbeelden van voor positieve controle gebruikte chemische stoffen worden gegeven in tabel 1 hieronder. Er kunnen ook alternatieve positieve controlestoffen worden gebruikt, indien dat wordt gemotiveerd. Omdat in-vitrogenotoxiciteitstests op zoogdiercellen voldoende gestandaardiseerd zijn voor korte behandelingen (3-4 uur) die gelijktijdig met en zonder metabole activering met dezelfde behandelingsduur worden toegepast, kan het gebruik van positieve controles worden beperkt tot een mutageen dat metabole activering nodig heeft. In dat geval zal deze ene positieve controterespons zowel de activiteit van het metabole activeringssysteem als de gevoeligheid van het testsysteem aantonen. Indien toegepast, moet een langlopende behandeling (d.w.z. 24 uur zonder S9) echter haar eigen positieve controle hebben, omdat de behandelingsduur zal afwijken van de test waarbij metabole activering wordt toegepast. Elke positieve controle moet worden gebruikt bij een of meer concentraties waarvoor een reproduceerbare en detecteerbare stijging ten opzichte van het achtergrondniveau kan worden verwacht, om de gevoeligheid van het testsysteem aan te tonen, en de respons mag niet in het gedrang komen door een mate van cytotoxiciteit die de in deze TM gespecificeerde grenzen overschrijdt (zie punt 28).

Tabel 1

Aanbevolen referentiestoffen voor het beoordelen van de bekwaamheid van laboratoria en voor het selecteren van positieve controles

Categorie	Stof	CAS RN
1. Mutagenen werkzaam zonder metabolische activering		
	Methylmethaansulfonaat	66-27-3
	Mitomycine C	50-07-7
	4-Nitrochinoline-N-oxide	56-57-5
2. Mutagenen waarvoor metabolische activering vereist is		
	Benzo[a]pyreen	50-32-8
	Cyclofosfamide (monohydraat)	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-Dimethylbenzantraceen	57-97-6
	3-Methylcholantreen	56-49-5

PROCEDURE

Behandeling met teststof

33. Delende cellen worden zowel met als zonder metabool activeringssysteem met de teststof behandeld. De blootstelling moet gedurende een geschikte periode worden uitgevoerd (meestal is 3 tot 4 uur voldoende). Er zij echter opgemerkt dat deze eisen voor geneesmiddelen voor menselijk gebruik anders kunnen zijn (59). Voor de MLA moet in gevallen waarin een korte behandeling negatieve resultaten oplevert en er informatie is waaruit kan worden opgemaakt dat mogelijk een langere behandeling nodig is [bv. nucleosideanalogen, slecht oplosbare chemische stoffen (5) (59)], worden overwogen om de test uit te voeren met een langere behandeling, d.w.z. 24 uur zonder S9.
34. Het minimale aantal cellen dat voor elke testcultuur (controle en behandeld) in elke fase van de test wordt gebruikt, moet worden gekozen op basis van de spontane mutantfrequentie. Een algemene vuistregel is om in elke testcultuur voldoende cellen te behandelen en over te enten om in alle fasen van de test (behandeling, fenotypische expressie en selectie van de mutanten) ten minste 10, liefst 100 spontane mutanten over te houden (56).
35. Voor de MLA ligt de aanbevolen aanvaardbare spontane mutantfrequentie tussen de $35-140 \times 10^{-6}$ (agarversie) en $50-170 \times 10^{-6}$ (microtiterplaat-versie) (zie tabel 2). Om voor elke testcultuur ten minste 10 en idealiter 100 spontane mutanten te hebben die de behandeling overleven, moeten er ten minste 6×10^6 cellen worden behandeld. Door dit aantal cellen te behandelen en voldoende cellen over te houden tijdens de expressie en de klonering voor het selecteren van mutanten, zijn er in alle fasen van het experiment voldoende spontane mutanten (10 of meer), ook voor de culturen die worden behandeld met concentraties die 90 % cytotoxiciteit vertonen (zoals gemeten door een RTF van 10 %) (19) (38) (39).
36. Voor de TK6 ligt de spontane mutantfrequentie meestal tussen de 2 en 10×10^{-6} . Om voor elke cultuur ten minste 10 spontane mutanten te hebben die de behandeling overleven, moeten er ten minste 20×10^6 cellen worden behandeld. Door dit aantal cellen te behandelen zijn er steeds voldoende spontane mutanten (10 of meer), ook voor de culturen die worden behandeld met concentraties die tijdens de behandeling 90 % cytotoxiciteit veroorzaken (10 % RS). Bovendien moeten er tijdens de expressieperiode voldoende cellen worden gekweekt en uitgeplaat voor het selecteren van de mutanten (60).

Fenotypische expressietijd en meting van de cytotoxiciteit en de mutantfrequentie

37. Aan het einde van de behandelingsperiode worden de cellen gedurende een vooraf vastgestelde periode gekweekt om een vrijwel optimale fenotypische expressie van de geïnduceerde mutanten mogelijk te maken. Deze periode is specifiek voor elke cellijn. Voor de MLA is de fenotypische expressieperiode 2 dagen. Voor de TK6 is de fenotypische expressieperiode 3-4 dagen. Als een 24-uursbehandeling wordt toegepast, begint de expressieperiode na het einde van de behandeling.
38. Gedurende de fenotypische expressieperiode worden de cellen elke dag geteld. Voor de MLA worden de dagelijkse celaantallen gebruikt om de dagelijkse suspensiegroei (SG) te berekenen. Na de expressieperiode van 2 dagen worden de cellen gesuspendeerd in medium met en zonder selecterende stof voor om respectievelijk het aantal mutanten (selectieplaten) en de kloneringsefficiëntie (levensvatbaarheidsplaten) te bepalen. Voor de MLA zijn er twee even aanvaardbare methoden voor de klonering voor het selecteren van de mutanten; de ene met zachte agar en de andere met vloeibaar medium in 96-putjesplaten (19) (38) (39). In de TK6 wordt de klonering uitgevoerd met vloeibare media en 96-putjesplaten (16).
39. Trifluorthymidine (TFT) is de enig aanbevolen selecterende stof voor TK-mutanten (61).
40. Voor de MLA worden agarplaten en microtiterplaten na 10-12 dagen incubatie geteld. Voor de TK6 worden kolonies in microtiterplaten na 10-14 dagen gescoord op de vroeg verschijnende mutanten. Om de langzaam groeiende (laat verschijnende) TK6-mutanten in aanmerking te nemen is het nodig de cellen na telling van de vroeg verschijnende mutanten nogmaals met groeimedium en TFT te voeden en de platen vervolgens nog 7-10 dagen te incuberen (62). Zie de punten 42 en 44 voor een bespreking van het tellen van de langzaam en snel groeiende TK-mutanten.
41. De benodigde berekeningen voor de beide tests, inclusief de twee methoden (agar en microtiterplaat) voor de MLA, worden gegeven in aanhangsel 2. Als de MLA wordt uitgevoerd volgens de agarmethode, worden de kolonies geteld en wordt het aantal mutantkolonies gecorrigeerd met de kloneringsefficiëntie om een MF te berekenen. In de microtiterplaatversie van de MLA en in de TK6 wordt de kloneringsefficiëntie voor zowel de selectieplaten als de kloneringsefficiëntieplaten bepaald aan de hand van de Poisson-verdeling (63). Uit deze beide kloneringsefficiënties wordt de MF berekend.

Karakterisering van de mutantkolonies

42. Als in de MLA de teststof positief is (zie de punten 62-63), moeten bij ten minste een van de testculturen (normaal gesproken de hoogste aanvaardbare positieve concentratie) en bij de negatieve en positieve controles de kolonies worden gekarakteriseerd door de grootte of de groei van de kolonies te inventariseren. Als de teststof negatief is (zie punt 64), moeten de mutantkolonies worden gekarakteriseerd bij de negatieve en positieve controles. Als de MLA wordt uitgevoerd met microtiterplaten, worden mutanten die kleine kolonies vormen gedefinieerd als mutanten waarvan de kolonies minder dan 25 % van de diameter van het putje beslaan en mutanten die grote kolonies vormen als mutanten waarvan de kolonies meer dan 25 % van de diameter van het putje beslaan. Bij de agarmethode wordt voor het tellen van de mutantkolonies en het inventariseren van de koloniegrootte een automatische kolonieteller gebruikt. Methoden voor het inventariseren van de koloniegrootte worden uitvoerig beschreven in de literatuur (19) (38) (40). Karakterisering van de kolonies van de negatieve en positieve controles is nodig om aan te tonen dat de tests naar behoren worden uitgevoerd.
43. De teststof kan niet als negatief worden aangemerkt als zowel de mutanten die grote kolonies vormen als de mutanten die kleine kolonies vormen onvoldoende worden gedetecteerd in de positieve controle. De karakterisering van de kolonies kan worden gebruikt om algemene informatie te verkrijgen over het vermogen van de teststof om puntmutaties en/of chromosomale gebeurtenissen te veroorzaken (punt 4).
44. TK6: normaal groeiende en langzaam groeiende mutanten worden van elkaar onderscheiden door een verschil in incubatietijd (zie punt 40). Voor de TK6 worden normaal gesproken voor alle culturen, inclusief de negatieve en positieve controles, zowel de vroeg als de laat verschijnende mutanten gescoord. Karakterisering van de kolonies van de negatieve en positieve controles is nodig om aan te tonen dat de tests naar behoren worden uitgevoerd. De teststof kan niet als negatief worden aangemerkt als zowel de vroeg verschijnende als de laat verschijnende mutanten onvoldoende worden gedetecteerd in de positieve controle. De karakterisering van de kolonies kan worden gebruikt om algemene informatie te verkrijgen over het vermogen van de teststof om puntmutaties en/of chromosomale gebeurtenissen te veroorzaken (punt 4).

Bekwaamheid van het laboratorium

45. Om aan te tonen over voldoende ervaring met de test te beschikken vooraleer wordt overgegaan tot routinematig gebruik ervan, moet het laboratorium een reeks experimenten hebben verricht met positieve controlestoffen die via verschillende mechanismen werken (ten minste één die actief is met en één die actief is zonder metabole activering, gekozen uit de stoffen die zijn opgesomd in tabel 1) en met verschillende negatieve controles (waaronder onbehandelde culturen en verschillende oplosmiddelen/vehicula). Deze positieve en negatieve controteresponsen moeten in overeenstemming zijn met de literatuur. Deze vereiste geldt niet voor laboratoria die ervaring hebben, d.w.z. die beschikken over referentiegegevens uit het verleden zoals omschreven in de punten 47-50. Voor de MLA moeten de waarden die worden verkregen met de positieve en negatieve controles, consistent zijn met de aanbevelingen van de IWGT (zie tabel 2).
46. Om te bewijzen dat het laboratorium bekwaam is om mutagene chemische stoffen op te sporen, de doeltreffendheid van het metabole-activeringssysteem te bepalen en de geschiktheid van de celgroeioomstandigheden tijdens behandeling, fenotypische expressie en selectie van de mutanten en de geschiktheid van de scoringsprocedures aan te tonen, moet er een selectie van positieve controlestoffen (zie tabel 1) worden onderzocht zowel met korte en lange behandeling (indien lange behandelingen worden toegepast) zonder metabole activering, als met korte behandeling met metabole activering. Er moet een bereik van concentraties van de geselecteerde stoffen worden gekozen dat reproduceerbare en concentratiegerelateerde stijgingen tot boven het achtergrondniveau oplevert, om de gevoeligheid en het dynamisch bereik van het testsysteem aan te tonen.

Controlegegevens uit het verleden

47. Het laboratorium stelt vast:
- een historisch bereik en historische spreiding voor de positieve controles;
 - een historisch bereik en historische spreiding voor de negatieve controles (met onbehandelde controlestoffen of oplosmiddelen).
48. Wanneer voor het eerst gegevens worden vergaard voor een historische spreiding voor negatieve controles, dienen gelijktijdige negatieve controles te stroken met gepubliceerde gegevens over negatieve controles. Naarmate meer gegevens uit experimenten aan de controlespreiding worden toegevoegd, dienen gelijktijdige negatieve controles idealiter binnen de controlegrens van 95 % voor die spreiding te vallen (64) (65).
49. De databank met gegevens over negatieve controles uit het verleden van het laboratorium moet aanvankelijk worden samengesteld op basis van minimaal 10 experimenten, maar bestaat bij voorkeur uit ten minste 20 experimenten die onder vergelijkbare experimentele omstandigheden werden uitgevoerd. Laboratoria dienen methoden voor kwaliteitscontrole, zoals regelkaarten (bv. C-kaart of X-kaart (65)), te gebruiken om na te gaan hoe variabel hun gegevens over positieve en negatieve controles zijn en om aan te tonen dat zij de methodologie „onder controle” hebben (66). Nadere bijzonderheden en aanbevelingen wat betreft de opbouw en het gebruik van een databank met historische gegevens zijn te vinden in de literatuur (64).
50. Negatieve controlegegevens moeten bestaan uit de mutantfrequenties van enkelvoudige of bij voorkeur duploculturen zoals beschreven in punt 27. Gelijktijdige negatieve controles liggen idealiter binnen de 95 %-controlegrenzen van de verdeling van de verzameling historische negatieve controlegegevens van het laboratorium. Wanneer gegevens van negatieve controles buiten de 95 %-controlegrens vallen, kan opnemings ervan in de historische controleverdeling toch aanvaardbaar zijn zolang deze gegevens geen extreme uitschieters zijn, er bewijs is dat het testsysteem „onder controle” is (zie punt 49) en er geen bewijs is van technisch of menselijk falen.
51. Eventuele aanpassingen van het testprotocol moeten worden bekeken vanuit het oogpunt van de samenhang van de gegevens met de bestaande historische controledatabanken van het laboratorium. Eventuele grote inconsistenties moeten leiden tot de oprichting van een nieuwe databank met historische controlegegevens.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Presentatie van de resultaten

52. Voor zowel de MLA als de TK6 moeten in de presentatie van de gegevens voor zowel de behandelde culturen als de controleculturen alle gegevens worden opgenomen die nodig zijn om de cytotoxiciteit (respectievelijk RTG of RS) en de mutantfrequenties te berekenen, zoals hieronder beschreven.
53. Voor de MLA moeten voor elke cultuur apart gegevens worden verstrekt over de RSG, de RTG, de klonerings-efficiëntie op het moment van selecteren van de mutanten en het aantal mutantkolonies (voor de agarversie) of het aantal lege putjes (voor de microtiterplaatversie). De MF moet worden uitgedrukt als het aantal mutantcellen per miljoen overlevende cellen. Als de respons positief is, moeten voor ten minste één concentratie van de teststof (normaal gesproken de hoogste positieve concentratie) en de negatieve en positieve controles MF's voor kleine en grote kolonies (en/of percentage van de totale MF) worden verstrekt. Als de respons negatief is, moeten voor de negatieve controle en de positieve controle de MF's voor kleine en grote kolonies worden verstrekt.
54. Voor de TK6 moeten voor elke cultuur apart gegevens worden verstrekt over de RS, de kloneringsefficiëntie op het moment van selecteren van de mutanten en het aantal lege putjes voor vroeg verschijnende en laat verschijnende mutanten. De MF's moeten worden uitgedrukt als de verhouding tussen het aantal mutantcellen en het aantal overlevende cellen, waarbij zowel de totale MF als de MF (en/of het percentage van de totale MF) van de vroeg verschijnende en laat verschijnende mutanten moeten worden verstrekt.

Aanvaardbaarheidscriteria

55. Voor zowel de MLA als de TK6 moet aan de volgende criteria worden voldaan, voordat de algemene resultaten voor een bepaalde teststof worden vastgesteld:
- de test is onder twee experimentele omstandigheden uitgevoerd (korte behandeling met en zonder metabole activering – zie punt 33), tenzij één al positieve resultaten heeft opgeleverd;
 - er moet een voldoende aantal cellen en concentraties geanalyseerd kunnen worden (zie punten 27 en 34-36);
 - de criteria voor de selectie van de hoogste concentratie zijn consistent met de criteria beschreven in de punten 28-30.

Aanvaardbaarheidscriteria voor de negatieve en positieve controles

56. De MLA-deskundigenwerkgroep van de IWGT heeft een grote hoeveelheid MLA-gegevens geanalyseerd, wat geresulteerd heeft in een internationale consensus voor specifieke aanvaardbaarheidscriteria voor de MLA (1) (2) (3) (4) (5). In deze testmethode worden dan ook specifieke aanbevelingen gedaan voor het bepalen van de aanvaardbaarheid van negatieve en positieve controles en voor het beoordelen van de resultaten voor een bepaalde stof in de MLA. De databank voor de TK6 is veel kleiner en is niet door een werkgroep geëvalueerd.
57. Voor de MLA moet elk experiment worden geëvalueerd om te bepalen of de onbehandelde controle/oplosmiddelcontrole aan de aanvaardbaarheidscriteria van de MLA-deskundigenwerkgroep van de IWGT voldoet ((4) en tabel 2 hieronder) voor de: 1) MF (er zij op gewezen dat de IWGT voor de aanvaardbaarheid van de MF verschil maakt tussen de agarversie en de microtiterplaatversie van de MLA), 2) de kloneringsefficiëntie (CE) op het moment van selecteren van de mutanten en 3) de suspensiegroei (SG) voor de oplosmiddelcontrole (zie aanhangsel 2 voor de formules).

Tabel 2

Aanvaardbaarheidscriteria voor de MLA

Parameter	Methode met zachte agar	Methode met microtiterplaten
Mutantfrequentie	35 – 140 × 10 ⁻⁶	50 – 170 × 10 ⁻⁶
Kloneringsefficiëntie	65 – 120 %	65 – 120 %
Suspensiegroei	8- tot 32-voudig (behandeling van 3-4 uur) 32- tot 180-voudig (behandeling van 24 uur, indien uitgevoerd)	8- tot 32-voudig (behandeling van 3-4 uur) 32- tot 180-voudig (behandeling van 24 uur, indien uitgevoerd)

58. Voor de MLA moet elke test ook worden geëvalueerd om te bepalen of voor de positieve controle(s) aan ten minste één van de volgende twee door de MLA-deskundigenwerkgroep van de IWGT ontwikkelde aanvaardbaarheidscriteria wordt voldaan:
- de positieve controle moet een absolute toename in de totale MF vertonen, d.w.z. een toename die hoger is dan de spontane achtergrond-MF (een geïnduceerde MF, of IMF) van ten minste 300×10^{-6} . De MF van de kleine kolonies moet goed zijn voor ten minste 40 % van de IMF;
 - de positieve controle vertoont een toename in de MF voor kleine kolonies van ten minste 150×10^{-6} boven de MF in de gelijktijdige onbehandelde controle/oplosmiddelcontrole (een IMF voor kleine kolonies van 150×10^{-6}).
59. Voor de TK6 is de test aanvaardbaar als toevoeging van de gelijktijdige negatieve controle aan de databank met historische negatieve controlegegevens van het laboratorium zoals beschreven in de punten 48-49 aanvaardbaar wordt geacht. Bovendien moeten de gelijktijdige positieve controles (zie punt 32) reacties induceren die verenigbaar zijn met de reacties in de databank met historische positieve controlegegevens en moeten een statistisch significante toename opleveren vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle.
60. Voor beide tests moet de bovengrens voor de cytotoxiciteit die wordt waargenomen in de positievecontrolecultuur, gelijk zijn aan die in de experimentele culturen. Met andere woorden: de RTG/RS mag niet lager zijn dan 10 %. Om aan te tonen dat aan de aanvaardbaarheidscriteria voor de positieve controle wordt voldaan, is het voldoende om een enkele concentratie te gebruiken (of een van de concentraties van de positievecontroleculturen als er meer dan een concentratie wordt gebruikt). Bovendien moet de MF van de positieve controle binnen het aanvaardbare bereik liggen dat voor het laboratorium is vastgesteld.

Beoordeling en interpretatie van resultaten

61. Voor de MLA heeft de MLA-werkgroep van de IWGT veel werk verricht op het vlak van de biologische relevantie en de criteria voor een positieve respons (4). Daarom zijn in deze testmethode specifieke aanbevelingen opgenomen voor het interpreteren van de teststofresultaten van de MLA (zie de punten 62-64). De databank voor de TK6 is veel kleiner en is niet door een werkgroep geëvalueerd. De aanbevelingen voor het interpreteren van de gegevens voor de TK6 worden dan ook in veel algemenere termen geformuleerd (zie de paragrafen 65-66). Bovendien worden er aanvullende aanbevelingen gedaan die voor beide tests gelden (zie de punten 67-71).

MLA

62. Er wordt een benadering aanbevolen voor het definiëren van positieve en negatieve responsen om er zeker van te zijn dat de toegenomen MF biologisch relevant is. In plaats van de statistische analyse die doorgaans voor andere tests wordt gebruikt, berust deze benadering op het gebruik van een vooraf bepaalde geïnduceerde mutantfrequentie (d.w.z. toename in de MF boven de gelijktijdige controle), die de Global Evaluation Factor (GEF) wordt genoemd en die is gebaseerd op een analyse van de distributie van de MF-gegevens voor de negatieve controle van deelnemende laboratoria (4). Voor de agarversie van de MLA is de GEF 90×10^{-6} , voor de microtiterplaatversie 126×10^{-6} .
63. Mits aan alle aanvaardbaarheidscriteria wordt voldaan, wordt een teststof als duidelijk positief beschouwd als in om het even welke van de onderzochte experimentele omstandigheden (zie punt 33) de toename van de MF boven de gelijktijdige achtergrond groter is dan de GEF en er een verband is tussen de toename en de concentratie (bv. aan de hand van een trendtoets). De teststof wordt dan in staat geacht mutatie te induceren in dit testsysteem.
64. Mits aan alle aanvaardbaarheidscriteria wordt voldaan, wordt een teststof als duidelijk negatief beschouwd als er in alle onderzochte experimentele omstandigheden (zie punt 33) geen enkele concentratiegerelateerde respons is of, wanneer er wel een toename is in de MF, als deze niet groter is dan de GEF. De teststof wordt dan niet in staat geacht mutaties te induceren in dit testsysteem.

TK6

65. Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt de teststof als duidelijk positief beschouwd als in een of meer van de onderzochte experimentele omstandigheden (zie punt 33):

- ten minste één van de testconcentraties een statistisch significante toename vertoont vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle;
- de toename concentratiegerelateerd is bij evaluatie met een geschikte trendtoets (zie punt 33);
- een of meer van de resultaten buiten de verdeling van de historische negatieve controlegegevens vallen (bv. op Poisson-verdeling gebaseerde 95 %-controlegrens; zie punt 48).

Wanneer aan al deze criteria is voldaan, wordt de teststof in staat geacht mutaties te induceren dit testsysteem. Aanbevelingen voor de meest geschikte statistische methoden zijn te vinden in de literatuur (66) (67).

66. Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt de teststof als duidelijk negatief beschouwd als in alle onderzochte experimentele omstandigheden (zie punt 33):

- geen van de testconcentraties een statistisch significante toename vertoont vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle;
- er geen concentratiegerelateerde toename is bij evaluatie met een geschikte trendtoets;
- alle resultaten binnen de verdeling van de historische negatieve controlegegevens vallen (bv. op Poisson-verdeling gebaseerde 95 %-controlegrens; zie punt 48).

De teststof wordt dan niet in staat geacht mutaties te induceren in dit testsysteem.

Voor zowel MLA als TK6:

67. Als de maximale concentratie is gebaseerd op cytotoxiciteit, moet voor de hoogste concentratie worden gestreefd naar een RTG/RS tussen de 20 en 10 %. Er is consensus over dat er bij de interpretatie van positieve resultaten voor moet worden gezorgd dat deze niet alleen worden gevonden tussen 20 en 10 % RTG/RS en dat een resultaat niet als positief mag worden beschouwd als de toename in de MF alleen is opgetreden bij 10 % RTG/RS of lager (indien beoordeeld) (2) (59).

68. In sommige omstandigheden kunnen aanvullende gegevens nuttig zijn om vast te stellen dat een teststof niet mutageen is wanneer geen enkele cultuur een RTG-waarde vertoont van 10-20 % RTG/RS. Het betreft de volgende situaties: 1) Er is geen bewijs voor mutageniteit (bv. geen dosis-respons, geen MF's die hoger zijn dan de MF's in de gelijktijdige negatieve controle of de historische achtergrondbereiken enz.) in een reeks van gegevenspunten tussen de 100 % en 20 % RTG/RS en er is ten minste één gegevenspunt tussen de 20 en 25 % RTG/RS. 2) Er is geen bewijs voor mutageniteit (bv. geen dosis-respons, geen MF's die hoger zijn dan de MF's in de gelijktijdige negatieve controle of de historische achtergrondbereiken enz.) in een reeks van gegevenspunten tussen de 100 % en 25 % RTG/RS en er is ook een negatief gegevenspunt vlak onder de 10 % RTG/RS. In elk van beide situaties kan worden geconcludeerd dat de teststof negatief is.

69. Een duidelijk positieve of negatieve reactie hoeft niet te worden bevestigd.

70. In gevallen waarin de reactie noch duidelijk negatief noch duidelijk positief is zoals hierboven beschreven, en/of om de biologische relevantie van een resultaat te helpen vaststellen, moeten de gegevens door een deskundige en/of nader onderzoek worden beoordeeld. Het uitvoeren van een herhalingsexperiment onder mogelijk aangepaste experimentele omstandigheden [bv. concentratie-intervallen om de kans te vergroten dat gegevenspunten worden gevonden die binnen het bereik van 10-20 % RTG/RS liggen, andere omstandigheden bij metabole activering (d.w.z. S9-concentratie of S9-herkomst) en duur van de behandeling] kan nuttig zijn.

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

TESTVERSLAG

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

Teststof:

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

Stof die uit één component bestaat:

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

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

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

Oplosmiddel:

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

Cellen:

Voor de voorraadculturen van het laboratorium:

- type en bron van de cellen en geschiedenis van het testlaboratorium;
- kenmerken van het karyotype en/of modaal aantal chromosomen;
- methoden om de celculturen in leven te houden;
- afwezigheid van mycoplasma;
- verdubbelingstijden.

Testomstandigheden:

- achtergrond voor de keuze van de concentraties en het aantal celculturen, bijvoorbeeld gegevens over de cytotoxiciteit en beperkte oplosbaarheid;

- samenstelling van het medium, CO₂-concentratie, vochtigheidsgraad;
- concentratie van de teststof uitgedrukt als uiteindelijke concentratie in het kweekmedium (bv. µg of mg/ml of mM van kweekmedium);
- toegevoegde concentratie (en/of volume) van het oplosmiddel en de teststof in het kweekmedium;
- incubatietemperatuur;
- incubatietijd;
- duur van de behandeling;
- celdichtheid bij de behandeling;
- aard en samenstelling van het metabool activeringssysteem (bron van S9, methode voor de bereiding van de S9-mix, de concentratie of het volume van de S9-mix en S9 in het uiteindelijke kweekmedium, kwaliteitscontroles van S9);
- positieve en negatieve controlestoffen, uiteindelijke concentraties voor alle behandelingsomstandigheden;
- duur van de expressieperiode (met vermelding van het aantal geënte cellen en schema's voor enting en overenting, indien van toepassing);
- identiteit en concentratie van de selecterende stof;
- voor de MLA moet worden aangegeven welke versie is gebruikt (agar of microtiterplaat);
- criteria voor de aanvaardbaarheid van de tests;
- methoden die zijn gebruikt om het aantal levensvatbare en mutantcellen te bepalen;
- methoden die zijn gebruikt om de cytotoxiciteit te meten;
- eventuele aanvullende informatie die betrekking heeft op de cytotoxiciteit en gebruikte methode;
- duur van de incubatietijden na uitplating;
- definitie van kolonies van een bepaalde omvang en aard (bv. criteria voor „kleine” en „grote” kolonies);
- criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is;
- gebruikte methoden voor het bepalen van de pH, osmolaliteit, indien uitgevoerd, en neerslag, indien van toepassing.

Resultaten:

- aantal behandelde cellen en aantal overgeënte cellen voor elke cultuur;
- toxiciteitsparameters (RTG voor MLA en RS voor TK6);
- tekenen van neerslag en tijdstip van de bepaling;
- aantal uitgeplate cellen in selectief en niet-selectief medium;

- aantal kolonies in niet-selectief medium en aantal resistente kolonies in selectief medium en bijbehorende mutantfrequenties;
- inventarisatie van de grootte van de kolonies voor de negatieve en positieve controles en, als de teststof positief is, ten minste een concentratie, en bijbehorende mutantfrequenties;
- indien mogelijk het verband tussen concentratie en respons;
- gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve (oplosmiddel) en positieve controles (concentraties en oplosmiddelen);
- gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve (oplosmiddel) en positieve controles (concentraties en oplosmiddelen) met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking, aantal tests waarop de historische controles zijn gebaseerd;
- statistische analyses (voor afzonderlijke culturen en gepoolde duplo's indien van toepassing), en eventuele p-waarden, en voor de MLA, de GEF-evaluatie.

Bespreking van de resultaten

Conclusie

LITERATUUR

- (1) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35 (3): 185-190.
- (2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), *Environ. Mol. Mutagen.*, 40 (4): 292-299.
- (3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, *Mutation Res.*, 540: 127-140.
- (4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (1): 1-5.
- (5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, *Mutation. Res.*, 627 (1): 36-40.
- (6) OESO (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, nr. 234, OESO, Parijs.

- (7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. *Mutation, Res.*, 746 (1): 21-28.
- (8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. *Mutation Res.*, 493 (1-2): 101-114.
- (9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol. Sci.*, 109 (1): 96-105.
- (10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. *Proc. National. Academy. Sci. USA*, 87 (1): 51-55.
- (11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/TK^{+/-} Leads to TK^{-/-} Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, *Mutation Res.*, 84 (1): 169-181.
- (12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y TK^{-/-} Mutants Early in their Clonal History, *Mutation Res.*, 147 (5): 237-242.
- (13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFR) Mutants of L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151 (1): 161-174.
- (14) Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation Res.*, 178 (1): 143-153.
- (15) Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 18 (1): 77-87.
- (16) Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation. Res.*, 374 (1): 89-98.
- (17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. *Mol. Carcinogen.*, 28 (4): 203-14.
- (18) Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. *Mutation Res.*, 267 (1): 89-95.
- (19) Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y TK^{+/-} -3.7.2C) Forward Mutation Assay. In *Protocols in Genotoxicity Assessment* A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.
- (20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. and Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, *Mutation Res.*, 634 (1-2): 177-183.
- (21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutagen.*, 49 (6): 439-452.
- (22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. *Environ. Mutagen.*, 8 (6): 879-886.

- (23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268 (2): 297-305.
- (24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257: 147-204.
- (25) Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. *Mutation Res.*, 626 (1-2): 185-190.
- (26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. *Ann. N.Y. Academy Sci.*, 76: 673-680.
- (27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutation Res.*, 59(1): 61-108.
- (28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK^{+/-} 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 147 (5): 243-253.
- (29) Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 214 (2): 181-193.
- (30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M.(2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y TK^{+/-}-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (2): 127-131.
- (31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, *Environ. Mol. Mutagen.*, 55 (1): 35-42.
- (32) Storer, R.D., Jaynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y TK^{+/-} Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. *Mutation. Res.*, 373 (2): 157-165.
- (33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. *Mutagen.*, 19 (4): 263-268.
- (34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 84 (2): 411-416.
- (35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45 (2-3): 162-176.
- (36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. *Cancer. Res.*, 55 (1): 12-15.
- (37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in voorbereiding).

- (38) Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.
- (39) Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. In: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z and Caldwell(Eds) , 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.
- (40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid human Lymphoblasts. *Mutation Res.*, 94 (2): 467-485.
- (41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, O.W., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. *ATLA*, 33 (3): 261-287.
- (42) Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, *Mutation Res.*, 104 (4-5): 287-294.
- (43) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31 (6): 347-364.
- (44) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113 (3-4): 173-215.
- (45) Natarajan, A.T., Tate, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37 (1): 83-90.
- (46) Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. *Mutation Res.*, 66 (3): 277-290.
- (47) Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4 (1): 55-65
- (48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagen.*, 7 (3): 175-177.
- (49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312 (3): 241-261.
- (51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28 (1): 51-59.
- (52) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP).

- (53) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooley K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L. and Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, pp. 91-103.
- (54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environ. Mutagen.*, 5 (6): 795-801.
- (55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. *Mutation Res.*, 652 (2): 122-130.
- (56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), Cambridge University Press, pp. 66-101.
- (57) Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. *Mutation Res.*, 741 (1-2): 32-56.
- (58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, 54 (1): 36-43.
- (59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Beschikbaar op: [<https://www.federalregister.gov/a/2012-13774>].
- (60) Honma M. and Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 52 (5): 373-384.
- (61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient (TK^{-/-}) Mutants from L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.*, 85 (5): 363-378.
- (62) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. *Mutation Res.*, 216 (1): 9-17.
- (63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. *Anal. Biochem.*, 110 (1): 1-8.
- (64) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, *Mutation Res.*, 723 (2): 87-90.
- (65) Ryan T.P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.
- (66) OESO (2014). *Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines*. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 199), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.
- (67) Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Aneugeen: elke chemische stof die of elk proces dat leidt tot aneuploidie in cellen of organismen door de wisselwerking met componenten van de mitose en meiose in de celdelingscyclus.

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

Chemische stof: een stof of een mengsel.

Clastogeen: elke chemische stof die of elk proces dat structurele chromosoomafwijkingen veroorzaakt in populaties van cellen of organismen.

Cytotoxiciteit: voor de bepalingen bestreken in deze testmethode is cytotoxiciteit gelijkgesteld aan een vermindering van de relatieve totale groei (RTG) voor de MLA of de relatieve overleving (RS) voor de TK6.

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

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

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

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

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

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

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

Mutantfrequentie (MF): de verhouding tussen het aantal waargenomen mutantcellen en het aantal levensvatbare cellen.

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

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

Relatieve overleving (RS): de RS wordt gebruikt als maat voor behandelingsgerelateerde cytotoxiciteit in de TK6. De RS is de relatieve kloneringsefficiëntie (CE) van onmiddellijk na de celbehandeling uitgeplante cellen, gecorrigeerd voor eventueel verlies van cellen gedurende de behandeling, vergeleken met de kloneringsefficiëntie van de negatieve controle.

Relatieve suspensiegroei (RSG): voor de MLA: de relatieve, totale suspensiegroei over twee dagen van de testcultuur, vergeleken met de totale suspensiegroei over twee dagen van de negatieve/oplosmiddelcontrole (Clive en Spector, 1975). De RSG moet de relatieve groei omvatten van de testcultuur vergeleken met de negatieve/oplosmiddelcontrole tijdens de behandelingsperiode.

Relatieve totale groei (RTG): de RTG wordt gebruikt als maat voor behandelingsgerelateerde cytotoxiciteit in de MLA. De RTG is een maat voor de relatieve groei (ten opzichte van de vehiculumcontrole) van de testculturen tijdens de behandelingsfase, de tweedaagse expressiefase en de fase van de klonering voor het selecteren van de mutanten. De RSG van elke testcultuur wordt vermenigvuldigd met de relatieve kloneringsefficiëntie van de testcultuur op het moment van selecteren van de mutanten en uitgedrukt ten opzichte van de kloneringsefficiëntie van de negatieve/oplosmiddelcontrole (Clive en Spector, 1975).

S9-leverfractie: supernatant van leverhomogenaat na centrifugering bij 9 000 g, d.w.z. ruw leverextract.

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

Suspensiegroei (SG): de x-voudige toename van het aantal cellen in de loop van de behandelingsfase en de expressiefase van de MLA. Voor de korte (3 of 4 uur) behandeling wordt de SG berekend door de x-voudige toename op dag 1 te vermenigvuldigen met de x-voudige toename op dag 2. Als een 24-urige behandeling wordt toegepast, is de SG de x-voudige toename gedurende de 24-urige behandeling, vermenigvuldigd met de x-voudige toenames op expressiedagen 1 en 2.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

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

Aanhangsel 2

FORMULES

Cytotoxiciteit

Voor beide versies (agar en microtiterplaat) van de MLA

De cytotoxiciteit wordt gedefinieerd als de relatieve totale groei (RTG), die de relatieve suspensiegroei (RSG) omvat tijdens de 2-daagse expressieperiode en de relatieve kloneringsefficiëntie (RCE) verkregen op het moment van selecteren van de mutanten. De RTG, RSG en RCE worden alle drie uitgedrukt als percentage.

Berekening van de RSG: de suspensiegroei één (SG_1) is de groeisnelheid tussen dag 0 en dag 1 (celconcentratie op dag 1 / celconcentratie op dag 0) en suspensiegroei twee (SG_2) is de groeisnelheid tussen dag 1 en dag 2 (celconcentratie op dag 2 / celconcentratie op dag 1). De RSG is de totale SG ($SG_1 \times SG_2$) voor de behandelde cultuur vergeleken met de onbehandelde/oplosmiddelcontrole. Dus: $RSG = [SG_{1(test)} \times SG_{2(test)}] / [SG_{1(controle)} \times SG_{2(controle)}]$. De SG_1 moet worden berekend vanaf de oorspronkelijke celconcentratie die is gebruikt aan het begin van de behandeling van de cellen. Aldus wordt rekening gehouden met eventuele verschillen in cytotoxiciteit die optreden in de testcultu(u)r(en) tijdens de behandeling van de cellen.

De RCE is de relatieve kloneringsefficiëntie van de testcultuur vergeleken met de relatieve kloneringsefficiëntie van de onbehandelde/oplosmiddelcontrole, verkregen op het moment van selecteren van de mutanten.

Relatieve totale groei (RTG): $RTG = RSG \times RCE$

TK6

Relatieve overleving (RS):

De cytotoxiciteit wordt beoordeeld aan de hand van de relatieve overleving, d.w.z. de kloneringsefficiëntie (CE) van onmiddellijk na de behandeling uitgeplate cellen, gecorrigeerd voor eventueel verlies van cellen gedurende de behandeling, vergeleken met de kloneringsefficiëntie in de negatieve controles (waaraan een overleving van 100 % wordt toegekend). De correctie voor verlies van cellen tijdens de behandeling kan worden berekend als:

$$\text{Gecorrigeerde CE} = \text{CE} \times \frac{\text{Aantalcellenaan heteindevandebehandeling}}{\text{Aantalcellenaan hetbeginvandebehandeling}}$$

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

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

Mutantfrequentie voor zowel MLA als TK6:

De mutantfrequentie (MF) is de kloneringsefficiëntie van mutantkolonies in selectief medium (CE_M) gedeeld door de kloneringsefficiëntie in niet-selectief medium op het moment van selecteren van de mutanten (CE_V). Dat wil zeggen: $MF = CE_M / CE_V$. De berekening van deze twee kloneringsefficiënties wordt hieronder beschreven voor zowel de kloneringsmethode in agar als die in microtiterplaten.

MLA in Agar: in de versie van de MLA in zachte agar, worden het aantal kolonies op de plaat voor het selecteren van de mutanten (C_M) en het aantal kolonies op de ongeselecteerde plaat/de plaat voor het bepalen van de kloneringsefficiëntie (telling van levensvatbare cellen) (C_V) verkregen door rechtstreekse telling van de klonen. Wanneer er 600 cellen worden uitgeplaat voor het bepalen van de kloneringsefficiëntie (CE) voor de platen voor het selecteren van mutanten (CE_M) en de ongeselecteerde platen/de platen voor het bepalen van de kloneringsefficiëntie (telling van levensvatbare cellen) (CE_V) en er voor het selecteren van de mutanten 3×10^6 cellen worden gebruikt,

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

MLA en TK6 in microtiterplaten: in de microtiterplaatversie van de MLA, worden C_M en C_V bepaald door het waarschijnlijke aantal kolonies per putje (P) te vermenigvuldigen met het totale aantal putjes (TW) op de microtiterplaten.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Vanaf de nulterm van de Poissonverdeling (Furth *et al.*, 1981) wordt de P gegeven door

$$P = -\ln (EW / TW)$$

Waarbij EW staat voor lege putjes en TW voor het totale aantal putjes. Daaruit volgt:

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

Voor de microtiterplaatversie van de MLA worden de mutantfrequenties voor kleine en grote kolonies op gelijke wijze berekend aan de hand van het relevante aantal lege putjes voor kleine en grote kolonies.

Voor de TK6 worden de mutantfrequenties voor kleine en grote kolonies gebaseerd op de vroeg verschijnende en laat verschijnende mutanten.

B.68 IN-VITROTESTMETHODE MET KORTE BLOOTSTELLING VOOR DE IDENTIFICATIE VAN i) CHEMISCHE STOFFEN DIE ERNSTIG OOGLETSEL VEROORZAKEN, EN ii) CHEMISCHE STOFFEN WAARVOOR CLASSIFICATIE VOOR OOGIRRITATIE OF ERNSTIG OOGLETSEL NIET NODIG IS

INLEIDING

1. Deze testmethode (TM) is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 491 (2017) van de OESO. De testmethode met korte blootstelling (Short Time Exposure, STE) is een in-vitromethode die onder bepaalde voorwaarden en binnen specifieke beperkingen kan worden gebruikt voor de gevaarenindeling en etikettering van chemische stoffen (stoffen en mengsels) die ernstig oogletsel veroorzaken, en chemische stoffen waarvoor classificatie voor ernstig oogletsel of oogirritatie niet nodig is, zoals gedefinieerd door het mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, GHS) van de Verenigde Naties (VN) (1) en Verordening (EU) nr. 1272/2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels (CLP-verordening) (1).
2. Jarenlang is voor het beoordelen van het mogelijke gevaar van chemische stoffen voor de ogen voornamelijk een in-vivo-oogtest bij konijnen (TM B.5 (8), gelijkwaardig aan TG 405 van de OESO) gebruikt. Naar algemene verwachting zal er in de nabije toekomst geen in-vitro-alternatief komen dat op zichzelf de in-vivo-oogtest bij konijnen volledig zal kunnen vervangen om voorspellingen te doen voor het volledige responsbereik voor ernstig oogletsel of oogirritatie voor verschillende klassen chemische stoffen. Strategische combinaties van alternatieve testmethoden die worden gebruikt in een (trapsgewijze) teststrategie, kunnen de oogtest bij konijnen mogelijk echter wel volledig vervangen (2). De top-downbenadering is bedoeld voor het testen van chemische stoffen waarvan op basis van bestaande informatie verwacht kan worden dat ze een hoog irritatiepotentieel hebben of ernstig oogletsel veroorzaken. Anderzijds is de bottom-upbenadering bedoeld voor het testen van chemische stoffen waarvan op basis van bestaande informatie verwacht kan worden dat ze onvoldoende oogirritatie zullen veroorzaken om classificatie noodzakelijk te maken. Hoewel de STE-testmethode niet geacht wordt de in-vivo-oogtest bij konijnen volledig te kunnen vervangen, is zij wel bruikbaar als onderdeel van een trapsgewijze teststrategie voor classificatie en etikettering volgens de regelgeving, zoals de top-down-/bottom-upbenadering, voor het identificeren zonder verdere tests van i) chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken (VN-GHS/CLP-categorie 1), en ii) chemische stoffen (uitgezonderd sterk vluchtige stoffen en alle vaste chemische stoffen, behalve oppervlakteactieve stoffen) waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is (VN-GHS/CLP Geen categorie) (1) (2). Voor een chemische stof waarvoor met de STE-testmethode niet wordt voorspeld dat deze ernstig oogletsel veroorzaakt (VN-GHS/CLP-categorie 1), en die evenmin als VN-GHS/CLP Geen categorie (veroorzaakt geen ernstig oogletsel of oogirritatie) wordt aangemerkt, moeten echter aanvullende tests worden uitgevoerd om tot een definitieve classificatie te komen. Bovendien moeten, voordat de STE-testmethode wordt gebruikt in een bottom-upbenadering volgens andere classificatiesystemen dan het VN-GHS/CLP-systeem, de toepasselijke regelgevingsinstanties worden geraadpleegd. Bij de keuze van de meest geschikte testmethode en het gebruik van deze testmethode moet de OESO-leidraad voor een geïntegreerde test- en beoordelingsbenadering (Integrated Approach on Testing and Assessment, IATA) voor ernstig oogletsel en oogirritatie worden gevolgd (14).
3. Deze testmethode is bedoeld om de procedures te beschrijven om het mogelijke gevaar van een teststof voor de ogen te beoordelen op basis van het vermogen van deze chemische stof om cytotoxiciteit te veroorzaken in de STE-testmethode. Het cytotoxische effect van chemische stoffen op de hoornvliesepitheelcellen is een belangrijk werkingsmechanisme (mode of action, MOA) dat tot schade aan het corneale epitheel en oogirritatie leidt. De levensvatbaarheid van cellen in de STE-testmethode wordt bepaald door kwantitatieve meting, na extractie uit de cellen, van blauw formazaanzout dat door de levende cellen wordt geproduceerd door enzymatische omzetting van de vitale kleurstof MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromide), die ook bekend is onder de naam thiazolylblauw tetrazoliumbromide (3). De verkregen cellevensvatbaarheid wordt vergeleken met de oplosmiddelcontrole (relatieve levensvatbaarheid) en gebruikt om het mogelijke gevaar van de teststof voor de ogen te bepalen. Een teststof wordt ingedeeld als VN-GHS/CLP-categorie 1, wanneer zowel de concentratie van 5 % als die van 0,05 % tot een cellevensvatbaarheid leiden die gelijk is aan of lager dan (\leq) 70 %. Anderzijds wordt voorspeld dat een teststof moet worden ingedeeld als VN-GHS/CLP Geen categorie, wanneer zowel de concentratie van 5 % als die van 0,05 % tot een cellevensvatbaarheid van meer dan (gt:) 70 % leiden.
4. De term „teststof” wordt in deze teststof gebruikt om te verwijzen naar datgene dat wordt getest en houdt geen verband met de toepasselijkheid van de STE-testmethode op het testen van stoffen en/of mengsels. Definities worden gegeven in het aanhangsel.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

5. Deze testmethode is gebaseerd op een protocol dat is ontwikkeld door Kao Corporation (4). Dit protocol is aan twee verschillende valideringsstudies onderworpen: een studie door de valideringscommissie van de Japanse Vereniging

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

voor alternatieven voor dierproeven (JSAAE) (5) en een studie door het Japans Centrum voor de validering van alternatieve methoden (JaCVAM) (6). Op basis van de verslagen van de valideringsstudies en de Background Review Documents voor de testmethode heeft NICEATM/ICCVAM een onafhankelijke beoordeling door vakgenoten uitgevoerd (7).

6. Bij gebruik van de STE-testmethode om chemische stoffen (stoffen en mengsels) te identificeren die ernstig oogletsel veroorzaken (VN-GHS/CLP-categorie 1 (1)), is uit de gegevens die werden verkregen voor 125 chemische stoffen (zowel stoffen als mengsels), een algemene nauwkeurigheid gebleken van 83 % (104/125), een percentage vals-positieve uitslagen van 1 % (1/86) en een percentage vals-negatieve uitslagen van 51 % (20/39) in vergelijking met de in-vivo-oogtest bij konijnen (7). Het verkregen percentage vals-negatieve uitslagen is niet kritiek in deze context, omdat alle teststoffen die een cellevensvatbaarheid van ≤ 70 % bij een concentratie van 5 % en > 70 % bij een concentratie van 0,05 % veroorzaken, vervolgens worden getest met andere afdoend gevalideerde in-vitrotestmethoden, of als laatste optie met de in-vivo-oogtest bij konijnen, afhankelijk van de wettelijke voorschriften en volgens de huidige aanbevolen sequentiële teststrategie en op bewijskracht gebaseerde aanpakken (1) (8). Er werden voornamelijk stoffen die bestaan uit één component getest, hoewel er ook een beperkte hoeveelheid gegevens beschikbaar is over het testen van mengsels. De testmethode is vanuit technisch oogpunt evenwel toepasbaar voor het testen van stoffen die uit meerdere componenten bestaan en van mengsels. Voordat deze testmethode wordt gebruikt op een mengsel om gegevens te genereren voor een beoogd regelgevingsdoel, moet echter worden nagegaan of, en zo ja, waarom deze methode betrouwbare resultaten oplevert voor dat doel. Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is. De STE-testmethode vertoont geen andere specifieke tekortkomingen wanneer zij wordt gebruikt om teststoffen te identificeren als VN-GHS/CLP-categorie 1. Onderzoekers zouden kunnen overwegen deze testmethode voor teststoffen te gebruiken, waarbij een cellevensvatbaarheid ≤ 70 % bij zowel een concentratie van 5 % en een concentratie van 0,05 % moet worden geaccepteerd als indicatief voor een respons die ernstig oogletsel veroorzaakt waardoor de teststof zonder verdere tests moet worden ingedeeld in VN-GHS/CLP-categorie 1.
7. Bij gebruik van de STE-testmethode om chemische stoffen (stoffen en mengsels) te identificeren waarvoor classificatie voor oogirritatie en ernstig oogletsel niet nodig is (d.w.z. VN-GHS/CLP Geen categorie), is uit de gegevens die werden verkregen voor 130 chemische stoffen (zowel stoffen als mengsels), een algemene nauwkeurigheid gebleken van 85 % (110/130), een percentage vals-negatieve uitslagen van 12 % (9/73) en een percentage vals-positieve uitslagen van 19 % (11/57), vergeleken met de in-vivo-oogtest bij konijnen (7). Als sterk vluchtige en vaste stoffen, behalve oppervlakteactieve stoffen, worden uitgesloten van de gegevensset, verbeteren de algemene nauwkeurigheid tot 90 % (92/102), het percentage vals-negatieve uitslagen tot 2 % (1/54) en het percentage vals-positieve uitslagen tot 19 % (9/48) (7). De mogelijke tekortkomingen van de STE-testmethode, wanneer zij wordt gebruikt om teststoffen te identificeren waarvoor classificatie voor oogirritatie en ernstig oogletsel niet nodig is (VN-GHS/CLP Geen categorie), zijn daarom een hoog percentage vals-negatieve uitslagen voor i) sterk vluchtige stoffen met een dampdruk van meer dan 6 kPa en ii) vaste chemische stoffen (stoffen en mengsels) behalve oppervlakteactieve stoffen en mengsels die enkel uit oppervlakteactieve stoffen bestaan. Dergelijke chemische stoffen worden van het toepassingsgebied van de STE-testmethode uitgesloten (7).
8. Behalve de chemische stoffen die worden genoemd in de punten 6 en 7, bevat de gegevensset die met de STE is gegenereerd, ook gegevens uit eigen laboratorium voor 40 mengsels. Deze hadden, vergeleken met de in-vivo-Draize-oogtest, een algemene nauwkeurigheid van 88 % (35/40), een percentage vals-positieve uitslagen van 50 % (5/10) en een percentage vals-negatieve uitslagen van 0 % (0/30) voor voorspellingen voor mengsels waarvoor classificatie volgens de VN-GHS/CLP-classificatiesystemen niet nodig is (9). De STE-testmethode is daarom wel toepasbaar om mengsels te identificeren als VN-GHS/CLP Geen categorie in een bottom-upbenadering met uitzondering van vaste mengsels, tenzij deze enkel uit oppervlakteactieve stoffen bestaan, als uitbreiding van de beperking ervan voor vaste stoffen. Bovendien moeten mengsels die stoffen bevatten met een dampdruk van meer dan 6 kPa, zorgvuldig worden beoordeeld om onderschatting te vermijden. Het gebruik van de testmethode voor deze mengsels moet per geval gerechtvaardigd worden.
9. De STE-testmethode mag niet worden gebruikt om teststoffen te identificeren als VN-GHS/CLP-categorie 2 of VN-GHS-categorie 2A (irriterend voor de ogen) of 2B (licht irriterend voor de ogen), vanwege het aanzienlijke aantal chemische stoffen van VN-GHS/CLP-categorie 1 waarvan het mogelijke gevaar voor de ogen werd onderschat als categorie 2, 2A of 2B en chemische stoffen van VN-GHS/CLP Geen categorie waarvan het mogelijke gevaar voor de ogen werd overschat als categorie 2, 2A of 2B (7). Voor dit doel kan het nodig zijn verdere tests met een andere geschikte methode uit te voeren.

10. De STE-testmethode is geschikt voor teststoffen die opgelost zijn of gedurende ten minste 5 minuten gelijkmatig gesuspenderd blijven in fysiologische zoutoplossing, 5 % dimethylsulfoxide (DMSO) in zoutoplossing, of minerale olie. De STE-testmethode is niet geschikt voor teststoffen die onoplosbaar zijn of niet gedurende ten minste 5 minuten gelijkmatig gesuspenderd blijven in fysiologische zoutoplossing, 5 % DMSO in zoutoplossing, of minerale olie. Bij de STE-testmethode kan minerale olie worden gebruikt vanwege de korte duur van de blootstelling. Daarom is de STE-testmethode geschikt om het mogelijke gevaar voor de ogen te voorspellen van teststoffen die onoplosbaar zijn in water (bv. vette alcoholen of ketonen), mits deze mengbaar zijn in ten minste een van de drie hierboven voorgestelde oplosmiddelen (4).
11. De term „teststof” wordt in deze teststof gebruikt om te verwijzen naar datgene dat wordt getest ⁽¹⁾, en houdt geen verband met de toepasselijkheid van de STE-testmethode op het testen van stoffen en/of mengsels.

PRINCIPE VAN DE TEST

12. De STE-testmethode is een op cytotoxiciteit gebaseerde in-vitrobepaling die wordt uitgevoerd op een confluente monolaag van cellen van SIRC-cellen (Statens Seruminstituut Rabbit Cornea) die worden gekweekt in een microtiterplaat van polycarbonaat met 96 putjes (4). Na vijf minuten blootstelling aan een teststof wordt de cytotoxiciteit kwantitatief gemeten als de relatieve cellevensvatbaarheid van SIRC-cellen met behulp van de MTT-test (4). De afgenomen cellevensvatbaarheid wordt gebruikt voor het voorspellen van mogelijke schadelijke effecten die tot oogschade kunnen leiden.
13. Er is beschreven dat wanneer een oplossing in het oog van een konijn wordt gedruppeld, 80 % ervan binnen drie à vier minuten via de conjunctivaalzak wordt uitgescheiden, terwijl van een oplossing die in een mensenoog wordt gedruppeld, meer dan 80 % binnen een à twee minuten wordt uitgescheiden (10). Met de STE-testmethode wordt gepoogd deze blootstellingstijden te benaderen en wordt de cytotoxiciteit als eindpunt gebruikt voor de beoordeling van de mate van beschadiging van SIRC-cellen na vijf minuten blootstelling aan de teststof.

AANTONING VAN BEKWAAMHEID

14. Voordat de STE-testmethode die in deze testmethode wordt beschreven, routinematig wordt gebruikt, moeten laboratoria hun technische bekwaamheid aantonen door een correcte indeling van de elf in tabel 1 aanbevolen stoffen. Deze stoffen zijn zodanig geselecteerd dat ze het volledige responsbereik voor ernstig oogletsel of oogirritatie vertegenwoordigen op basis van de resultaten van de in-vivo-oogtest bij konijnen (TG 405) en het VN-GHS/CLP-classificatiesysteem (1). Andere selectiecriteria waren onder meer dat de stoffen in de handel verkrijgbaar zijn, dat er in-vivoreferentiegegevens van zeer goede kwaliteit beschikbaar zijn en dat er met de STE-testmethode gegenereerde in-vitrogegevens van zeer goede kwaliteit beschikbaar zijn (3). Wanneer een stof uit de lijst niet beschikbaar is of indien zulks gerechtvaardigd is, mag een andere stof waarvoor voldoende in-vivo- en in-vitroreferentiegegevens beschikbaar zijn, worden gebruikt, mits dezelfde criteria als hier beschreven worden toegepast.

Tabel 1

Lijst van stoffen voor bekwaamheidstoetsing

Stof	CAS RN	Chemische klasse ⁽¹⁾	Fysische toestand	VN-GHS/CLP-cat. in vivo ⁽²⁾	Oplosmiddel in STE-test	VN-GHS/CLP-cat. STE
Benzalkoniumchloride (10 %, waterig)	8001-54-5	Onium-verbinding	Vloeistof	Categorie 1	Zoutoplossing	Categorie 1

⁽¹⁾ In juni 2013 heeft de gezamenlijke vergadering besloten dat er in nieuwe en bijgewerkte testmethoden waar mogelijk consequenter gebruikgemaakt moet worden van de term "teststof" om te beschrijven wat er getest wordt.

Stof	CAS RN	Chemische klasse (1)	Fysische toestand	VN-GHS/CLP-cat. in vivo (2)	Oplosmiddel in STE-test	VN-GHS/CLP-cat. STE
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Ether	Vloeistof	Categorie 1	Zoutoplossing	Categorie 1
Acid Red 92	18472-87-2	Heterocyclische verbinding; broomverbinding; chloorverbinding	Vaste stof	Categorie 1	Zoutoplossing	Categorie 1
Natriumhydroxide	1310-73-2	Alkali; Anorganische stof	Vaste stof	Categorie 1 (3)	Zoutoplossing	Categorie 1
Butyrolacton	96-48-0	Lacton; heterocyclische verbinding	Vloeistof	Categorie 2A (Categorie 2 in CLP)	Zoutoplossing	Er kan geen voorspelling worden gedaan
Octaan-1-ol	111-87-5	Alcohol	Vloeistof	Categorie 2A/B (4) (Categorie 2 in CLP)	Minerale olie	Er kan geen voorspelling worden gedaan
Cyclopentanol	96-41-3	Alcohol; Koolwaterstof, cyclisch	Vloeistof	Categorie 2A/B (5) (Categorie 2 in CLP)	Zoutoplossing	Er kan geen voorspelling worden gedaan
2-Ethoxyethylacetaat	111-15-9	Alcohol; Ether	Vloeistof	Geen categorie	Zoutoplossing	Geen categorie
Dodecaan	112-40-3	Koolwaterstof, acyclisch	Vloeistof	Geen categorie	Minerale olie	Geen categorie
Methylisobutylketon	108-10-1	Keton	Vloeistof	Geen categorie	Minerale olie	Geen categorie

Stof	CAS RN	Chemische klasse (1)	Fysische toestand	VN-GHS/CLP-cat. in vivo (2)	Oplosmiddel in STE-test	VN-GHS/CLP-cat. STE
1,1-Dimethylguanidinesulfaat	598-65-2	Amidine; Zwaavelverbinding	Vaste stof	Geen categorie	Zoutoplossing	Geen categorie

(1) Scheikundige klassen werden toegekend op basis van informatie uit eerdere publicaties van het NICEATM en, indien niet beschikbaar, aan de hand van de Medical Subject Headings (MeSH[®]) van de Amerikaanse National Library of Medicine (via ChemIDplus[®] [National Library of Medicine], beschikbaar op <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>) en structuurbepalingen door het NICEATM.

(2) Gebaseerd op de resultaten van de in-vivo-oogtest op konijnen (OESO TG 405) en aan de hand van het VN-GHS/CLP (1).

(3) De indeling in categorie 1 is gebaseerd op het potentieel voor huidcorrosie van 100 % natriumhydroxide (opgenomen in de lijst als chemische stof met potentieel voor huidcorrosie in OESO TG 435) en het criterium voor VN-GHS/CLP-categorie 1 (1).

(4) Indeling in categorie 2A of 2B hangt af van de interpretatie van het VN-GHS-criterium voor het onderscheiden van deze twee categorieën, d.w.z. 2 van de 6 versus 4 van de 6 dieren met effecten op dag 7 nodig voor indeling in categorie 2A. In de in-vivo-gegevensset werden 2 onderzoeken opgenomen met elk 3 dieren. In het ene onderzoek vertoonden twee van de drie dieren op dag 7 effecten die indeling in categorie 2A rechtvaardigen, terwijl in het andere onderzoek alle eindpunten voor alle drie de dieren op dag 7 hersteld waren, hetgeen indeling in categorie 2B rechtvaardigt (12).

(5) Indeling in categorie 2A of 2B hangt af van de interpretatie van het VN-GHS-criterium voor het onderscheiden van deze twee categorieën, d.w.z. 1 van de 3 versus 2 van de 3 dieren met effecten op dag 7 nodig voor indeling in categorie 2A. Het in-vivo-onderzoek omvatte 3 dieren. Alle eindpunten behalve vertroebeling van het hoornvlies en roodheid van de conjunctiva in één dier herstelden tot een score van nul op dag 7 of eerder. Het ene dier dat op dag 7 niet volledig was hersteld, had een score van 1 voor vertroebeling van het hoornvlies en een score van 1 voor de roodheid van de conjunctiva (op dag 7), die beide volledig waren hersteld op dag 14 (11).

Afkortingen: CAS RN = registratienummer van de Chemical Abstracts Service

PROCEDURE

Bereiding van de monolaag van cellen

- De STE-testmethode moet worden uitgevoerd met de SIRC-celijn van konijnenhoornvliescellen. Aanbevolen wordt om SIRC-cellen te betrekken van een goed gekwalificeerde celbank, zoals de American Type Culture Collection CCL60.
- SIRC-cellen worden gekweekt bij 37 °C in een vochtige atmosfeer met 5 % CO₂, in een kweekfles met een kweekmedium dat bestaat uit Eagle's Minimum Essential Medium (MEM), aangevuld met 10 % foetaal runderserum (FBS), 2 mM L-glutamine, 50-100 eenheden/ml penicilline en 50-100 µg/ml streptomycine. Cellen die confluent zijn geworden in de kweekfles, moeten worden gescheiden met een trypsine-ethyleendiaminetetraazijnzuur-oplossing, al dan niet met behulp van een celschraper. De cellen worden vermeerderd (bv. 2 tot 3 passages) in een kweekfles alvorens te worden gebruikt voor routinetests en mogen na ontdooiing niet meer dan 25 passages ondergaan.
- Cellen die gereed zijn voor gebruik in de STE-test, worden vervolgens bereid met een passende dichtheid en geënt in microtiterplaten met 96 putjes. De aanbevolen celdichtheid bij het enten is 6,0 × 10³ cellen per putje, wanneer de cellen vier dagen na het enten worden gebruikt, of 3,0 × 10³ cellen per putje, wanneer de cellen vijf dagen na het enten worden gebruikt, in een kweekvolume van 200 µl. Cellen die worden gebruikt voor de STE-test en die met de passende dichtheid worden geënt in een kweekmedium, bereiken op het moment van testen, d.w.z. vier of vijf dagen na het enten, een confluentie van meer dan 80 %.

Het aanbrengen van de teststoffen en de controlestoffen

18. Het eerstekeus-oplosmiddel voor het oplossen of suspenderen van teststoffen is fysiologische zoutoplossing. Als de teststof een lage oplosbaarheid heeft of niet opgelost of gedurende ten minste vijf minuten gelijkmatig gesuspenseerd kan worden in zoutoplossing, wordt als tweedekeus-oplosmiddel 5 % DMSO (CAS RN 67-68-5) in zoutoplossing gebruikt. Voor teststoffen die niet opgelost of gedurende ten minste vijf minuten gelijkmatig gesuspenseerd kunnen worden in zoutoplossing of 5 % DMSO in zoutoplossing, wordt minerale olie (CAS RN 8042-47-5) gebruikt als derdekeus-oplosmiddel.
19. Teststoffen worden opgelost of gelijkmatig gesuspenseerd in het geselecteerde oplosmiddel in een concentratie van 5 % (w/w) en verder serieel verdund met een factor 10 tot 0,5 % en 0,05 %. Elke teststof wordt getest in zowel een concentratie van 5 % als een concentratie van 0,05 %. De cellen die zijn gekweekt in een microtiterplaat met 96 putjes, worden gedurende vijf minuten bij kamertemperatuur blootgesteld aan 200 µl/putje van de teststofoplossing (of teststofsuspensie) in een concentratie van hetzij 5 %, hetzij 0,05 %. De teststoffen (stoffen die uit één component bestaan, of stoffen die uit meerdere componenten bestaan, of mengsels) worden als zuivere stoffen beschouwd en opgelost of gesuspenseerd volgens deze methode, ongeacht de zuiverheidsgraad.
20. Het in punt 16 beschreven kweekmedium wordt in elke plaat van elke herhaalde bepaling als mediumcontrole gebruikt. Bovendien worden de cellen eveneens in elke plaat van elke herhaalde bepaling aan oplosmiddelcontrolemonsters blootgesteld. Van de in punt 18 vermelde oplosmiddelen is bevestigd dat ze geen negatieve invloed hebben op de levensvatbaarheid van SIRC-cellen.
21. In de STE-testmethode wordt in elke plaat van elke herhaalde bepaling 0,01 % natriumlaurylsulfaat (SLS) in zoutoplossing als positieve controle gebruikt. Om de cellevensvatbaarheid van de positieve controle te berekenen, moet elke plaat van elke herhaalde bepaling ook een oplosmiddelcontrole van zoutoplossing bevatten.
22. Om de compensatie voor de optische dichtheid te bepalen is ook een blanco nodig. Deze moet worden uitgevoerd met putjes die alleen fosfaatgebufferde zoutoplossing bevatten, maar geen calcium en magnesium (PBS-) of cellen.
23. Elk monster (teststof in 5 % en 0,05 %, mediumcontrole, oplosmiddelcontrole en positieve controle) moet in elke herhaalde bepaling in drievoud worden getest door de cellen gedurende vijf minuten bij kamertemperatuur bloot te stellen aan 200 µl van de betreffende test- of controlestof.
24. IJkstoffen zijn nuttig voor de beoordeling van potentiële oogirritatie bij onbekende chemische stoffen uit een specifieke chemische klasse of productklasse of voor de beoordeling van potentiële relatieve irritatie van een voor het oog irriterende stof binnen een reeks van irritatieresponsen.

Meting van de cellevensvatbaarheid

25. Na de blootstelling worden de cellen tweemaal gewassen met 200 µl PBS en wordt er 200 µl MTT-oplossing (0,5 mg MTT/ml kweekmedium) toegevoegd. Na een reactietijd van twee uur in een incubator (37 °C, 5 % CO₂) wordt de MTT-oplossing gedecanteerd, wordt het MTT-formazan geëxtraheerd met 200 µl 0,04 N zoutzuur-isopropanol gedurende 60 minuten in een donkere kamer bij kamertemperatuur en wordt met een plaatlezer de extinctie van de MTT-formazanoplossing bij 570 nm gemeten. Interferentie van teststoffen met de MTT-test (door kleurstoffen of rechtstreeks MTT reducerende stoffen) treedt alleen op als er na het wassen (tussen blootstelling en meting) een significante hoeveelheid teststof in het testsysteem achterblijft, hetgeen wel het geval is met 3D-gereconstrueerd menselijk hoornvlies of gereconstrueerde humane epidermisweefsels, maar niet relevant is voor de 2D-celculturen die voor de STE-testmethode worden gebruikt.

Interpretatie van de resultaten en voorspellingsmodel

26. De waarden voor de optische dichtheid (OD) die voor elke teststof worden verkregen, worden vervolgens gebruikt voor het berekenen van de cellevensvatbaarheid in vergelijking met de oplosmiddelcontrole, die op 100 % wordt gesteld. De relatieve cellevensvatbaarheid wordt uitgedrukt als een percentage en verkregen door de OD van de teststof te delen door de OD van de oplosmiddelcontrole, nadat van beide waarden de OD van de blanco is afgetrokken.

$$\text{Cellelevensvatbaarheid(\%)} = \frac{(\text{OD}_{570} \text{ teststof}) - (\text{OD}_{570} \text{ blanco})}{(\text{OD}_{570} \text{ oplosmiddelcontrole}) - (\text{OD}_{570} \text{ of blanco})} \times 100$$

Evenzo wordt de relatieve cellevensvatbaarheid van elke oplosmiddelcontrole uitgedrukt als een percentage en verkregen door de OD van elke oplosmiddelcontrole te delen door de OD van de mediumcontrole, nadat van beide waarden de OD van de blanco is afgetrokken.

27. Er moeten drie onafhankelijke herhaalde bepalingen worden gedaan, elk met drie duploputjes (d.w.z. n=9). Aan de hand van het meetkundig gemiddelde van de drie putjes voor elke teststof en elke oplosmiddelcontrole in elke onafhankelijke herhaling wordt het meetkundige gemiddelde van de relatieve cellevensvatbaarheid berekend. Het uiteindelijke meetkundige gemiddelde van de cellevensvatbaarheid wordt berekend op basis van de drie onafhankelijke herhalingen.
28. De drempelwaarden voor de cellevensvatbaarheid om teststoffen te identificeren als chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken (VN-GHS/CLP-categorie 1), en teststoffen waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is (VN-GHS/CLP Geen categorie), worden hieronder gegeven.

Tabel 2

Voorspellingsmodel van de STE-testmethode

Cellelevensvatbaarheid:		VN-GHS/CLP-classificatie	Toepassing
Bij 5 %	Bij 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Geen categorie	Stoffen en mengsels, met uitzondering van: i) sterk vluchtige stoffen met een dampdruk van meer dan 6 kPa ⁽¹⁾ en ii) vaste chemische stoffen (stoffen en mengsels) behalve oppervlakreactieve stoffen en mengsels die enkel uit oppervlakreactieve stoffen bestaan
≤ 70 %	> 70 %	Er kan geen voorspelling worden gedaan	Niet van toepassing
≤ 70 %	≤ 70 %	Categorie 1	Stoffen en mengsels ⁽²⁾

⁽¹⁾ Mengsels die stoffen bevatten met een dampdruk van meer dan 6 kPa, moeten zorgvuldig worden beoordeeld om onderschatting te vermijden. Het gebruik van de testmethode voor deze mengsels moet per geval gerechtvaardigd worden.

⁽²⁾ Op basis van resultaten die zijn verkregen met stoffen die uit één component bestaan, hoewel er ook een beperkte hoeveelheid gegevens is over het testen van mengsels. De testmethode is vanuit technisch oogpunt evenwel toepasbaar voor het testen van stoffen die uit meerdere componenten bestaan en van mengsels. Voordat deze testmethode wordt gebruikt op een mengsel om gegevens te genereren voor een beoogd regelgevingsdoel, moet worden nagegaan of, en zo ja, waarom deze methode betrouwbare resultaten oplevert voor dat doel. Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is.

Aanvaardbaarheidscriteria

29. De testresultaten worden aanvaardbaar geacht wanneer aan alle onderstaande criteria wordt voldaan:
- a) de OD van de mediumcontrole (blootgesteld aan kweekmedium) moet, na aftrek van de blanco-OD, 0,3 of hoger zijn;

- b) de levensvatbaarheid van de oplosmiddelcontrole moet 80 % of hoger zijn in ten opzichte van de mediumcontrole. Als er in elke herhaling meerdere oplosmiddelcontroles worden gebruikt, worden de resultaten voor de teststoffen die met die oplosmiddelen zijn getest, aanvaardbaar geacht als elk van deze controles een cellevensvatbaarheid van meer dan 80 % laat zien;
- c) de cellevensvatbaarheid die wordt verkregen met de positieve controle (0,01 % SLS), moet binnen twee standaarddeviaties van het historische gemiddelde liggen. De bovenste en onderste aanvaardbaarheidsgrenzen voor de positieve controle moeten regelmatig worden bijgewerkt, d.w.z. eens in de drie maanden of elke keer dat een aanvaardbare test wordt uitgevoerd in laboratoria waar de tests niet regelmatig (d.w.z. minder dan eens per maand) worden uitgevoerd. Wanneer een laboratorium een onvoldoende aantal experimenten voltooit om een statistisch robuuste verdeling van positieve controles vast te stellen, is het aanvaardbaar om de bovenste en onderste aanvaardbaarheidsgrenzen te gebruiken die door de ontwikkelaar van de methode zijn vastgesteld, d.w.z. 21,1 % en 62,3 % volgens zijn historische laboratoriumgegevens, terwijl er tijdens de eerste routinetests een verdeling wordt opgebouwd voor het eigen laboratorium;
- d) de standaarddeviatie van de uiteindelijke cellevensvatbaarheid die wordt afgeleid uit de drie onafhankelijke herhalingen, moet kleiner zijn dan 15 % voor zowel de concentratie van 5 % als die van 0,05 % van de teststof.

Als aan een of meer van deze criteria niet wordt voldaan, moeten de resultaten worden verworpen en moeten drie nieuwe onafhankelijke herhalingen worden uitgevoerd.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

30. In het verslag moeten de gegevens voor elk afzonderlijk putje (bv. de waarden voor de cellevensvatbaarheid) van elke herhaling, evenals het algemene gemiddelde, de SD en de indeling worden opgenomen.

Testverslag

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

Teststof en controlestoffen

- stof die uit één component bestaat: chemische identificatie, zoals IUPAC- of CAS-na(a)m(en), CAS-registratienummer(s), SMILES- of InChI-code(s), structuurformules en/of andere identificatiemiddelen;
- stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB en mengsel: karakterisering, voor zover mogelijk aan de hand van bv. chemische identiteit (zie hierboven), zuiverheid, kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen (zie hierboven) van de bestanddelen, voor zover beschikbaar;
- fysische toestand, vluchtigheid, pH, logP, molecuulgewicht, chemische klassen en aanvullende fysisch-chemische eigenschappen die relevant zijn voor het uitvoeren van het onderzoek, voor zover beschikbaar;
- zuiverheid, chemische naam van onzuiverheden waar passend en praktisch haalbaar enz.;
- behandeling voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);
- bewaaromstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar.

Voorwaarden en procedures voor de testmethode

- naam en adres van de opdrachtgever, testinstallatie en de onderzoeksleider;
- een beschrijving van de gebruikte testmethode;

- de gebruikte cellijn, de herkomst ervan, het aantal passages en de confluente van de voor het testen gebruikte cellen;
- gedetailleerde informatie over de gebruikte testprocedure;
- het aantal gebruikte herhalingen en duplo's;
- de gehanteerde concentraties van de teststof (indien verschillend van de aanbevolen concentraties);
- motivering van de keuze van het oplosmiddel voor elke teststof;
- duur van de blootstelling aan de teststof (indien verschillend van de aanbevolen tijd);
- een beschrijving van eventuele wijzigingen in de testprocedure;
- een beschrijving van de gebruikte beoordelings- en beslissingscriteria;
- een verwijzing naar het historische gemiddelde en de bijbehorende standaarddeviatie (SD) voor de positieve controle;
- aantoning dat het laboratorium bekwaam is om de testmethode toe te passen (bv. door de stoffen voor bekwaamheidstoetsing te testen) of aantoning dat de prestaties van de testmethode in de loop van de tijd kunnen worden gereproduceerd.

Resultaten

- voor elke teststof en controlestof, en elke geteste concentratie, moeten de afzonderlijke OD-waarden per duplo-puntje, het rekenkundig gemiddelde van de OD-waarden voor elke onafhankelijke herhaling, de procentuele cellevensvatbaarheid voor elke onafhankelijke herhaling en het uiteindelijke rekenkundige gemiddelde van de procentuele cellevensvatbaarheid en de bijbehorende SD over drie herhalingen in een tabel worden weergegeven;
- resultaten voor medium-, oplosmiddel- en positieve controle waaruit blijkt dat het onderzoek aan de aanvaardbaarheidscriteria voldoet;
- een beschrijving van andere waargenomen effecten;
- de uiteindelijk uit de resultaten afgeleide indeling met vermelding van het gebruikte voorspellingsmodel/de gehanteerde beslissingscriteria.

Bespreking van de resultaten

Conclusies

LITERATUUR

- (1) Verenigde Naties (VN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Genève: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Beschikbaar op: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

- (3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (4) Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22,760-770.
- (5) Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25,796-809.
- (6) Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, pp.1855-1869.
- (7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Beschikbaar op: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].
- (8) Hoofdstuk B.5 van deze bijlage, Acute oogirritatie/-corrosie.
- (9) Saito K, *et al.* (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.
- (10) Mikkelsen TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm. Sci.*1648-1653.
- (11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Brussels, Belgium.
- (12) Gautheron P, *et al.* (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. *Fundam Appl Toxicol.* 18, 442-449.
- (13) OESO (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.
- (14) OESO (2017). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Serious Eye Damage and Eye Irritation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

Aanhangsel

DEFINITIES

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een testmethode, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden uitgevoerd. De betrouwbaarheid wordt beoordeeld door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid en intralaboratoriumherhaalbaarheid (13).

Bottom-upbenadering: een trapsgewijze benadering die wordt gebruikt voor een teststof waarvan wordt vermoed dat classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is, die begint met het onderscheiden van chemische stoffen waarvoor classificatie niet nodig is (negatief resultaat) van andere chemische stoffen (positief resultaat).

Chemische stof: een stof of een mengsel.

Ernstig oogletsel: weefselbeschadiging in het oog of een ernstige fysieke gezichtsvermindering na het aanbrengen van een teststof op het oppervlak aan de voorzijde van het oog, die binnen 21 dagen na het aanbrengen niet volledig omkeerbaar is. Verwisselbaar met „Omkeerbare effecten op ogen” en met „VN-GHS/CLP-categorie 1”.

Gevaar: inherente eigenschap van een agens of situatie die nadelige effecten kan veroorzaken als een organisme, systeem of (sub)populatie aan dit agens wordt blootgesteld.

Gevoeligheid: het percentage van alle positieve/actieve chemische stoffen dat door middel van de testmethode correct wordt ingedeeld. Dit is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert en is een belangrijke factor voor de beoordeling van de relevantie van een testmethode (10).

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

Ijkstof: een stof die wordt gebruikt als norm voor vergelijking met een teststof. Een ijkstof moet de volgende eigenschappen hebben: i) (een) constante en betrouwbare bron(nen); ii) een structurele en functionele gelijkenis met de klasse stoffen die getest wordt; iii) hun fysische/chemische kenmerken moeten bekend zijn; iv) ondersteunende gegevens over bekende effecten en v) een bekende werkzaamheid binnen het bereik van de gewenste respons.

Mediumcontrole: een onbehandeld monster dat alle componenten bevat van een testsysteem. Dit monster wordt samen met de met de teststof behandelde monsters en andere controlemonsters verwerkt om te bepalen of het oplosmiddel interageert met het testsysteem.

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

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

Nauwkeurigheid: de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de testmethode en erkende referentiewaarden. Dit is een maat voor de prestaties van de testmethode en één aspect van relevantie. Deze term en de term „concordantie”, waaronder het percentage correcte uitkomsten van een testmethode wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt (13).

OD: optische dichtheid.

Oogirritatie: veranderingen in het oog na het aanbrengen van een teststof op het oppervlak aan de voorzijde van het oog, die binnen 21 dagen na het aanbrengen volledig omkeerbaar zijn. Verwisselbaar met „Omkeerbare effecten op ogen” en met „VN-GHS/CLP-categorie 2”.

Oplosmiddel-/vehiculumcontrole: een onbehandeld monster dat alle componenten bevat van een testsysteem, met inbegrip van het oplosmiddel of vehiculum, dat tezamen met de met de teststof behandelde monsters en andere controlemonsters verwerkt wordt om de referentierespons voor de monsters die behandeld werden met de in hetzelfde oplosmiddel of vehiculum opgeloste teststof vast te stellen. Als dit monster getest wordt met een tegelijkertijd gemeten mediumcontrole, toont het ook aan of het oplosmiddel of vehiculum met het testsysteem interageert.

Oppervlakteactieve stof: ook „agens dat inwerkt op de oppervlakte” genoemd. Dit is een chemische stof, zoals een detergens, die de oppervlaktespanning van een vloeistof kan verlagen en het zo mogelijk maakt dat de vloeistof gaat schuimen of in vaste stoffen doordringt; ook bekend als een bevochtigingsmiddel.

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

Percentage vals-negatieve uitslagen: het percentage van alle positieve chemische stoffen dat door een testmethode onterecht als negatief wordt geïdentificeerd. Het is één indicator van de prestaties van de testmethode.

Percentage vals-positieve uitslagen: het percentage van alle negatieve chemische stoffen dat door een testmethode onterecht als positief wordt geïdentificeerd. Het is één indicator van de prestaties van de testmethode.

Relevantie: beschrijving van het verband van de test met het te onderzoeken effect en of de test betekenis heeft en nuttig is voor een bepaald doel. Het is de mate waarin de test het te onderzoeken biologische effect correct meet of voorspelt. Relevantie omvat een beoordeling van de nauwkeurigheid (concordantie) van een testmethode (10).

Specificiteit: het percentage van alle negatieve/inactieve chemische stoffen dat door de test correct wordt ingedeeld. Dit is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert en is een belangrijke factor voor de beoordeling van de relevantie van een testmethode (13).

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

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

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

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

Top-downbenadering: een trapsgewijze benadering die gebruikt wordt voor een teststof waarvan wordt vermoed dat deze ernstig oogletsel veroorzaakt, die begint met het onderscheiden van chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken (positief resultaat) van andere chemische stoffen (negatief resultaat).

Trapsgewijze teststrategie: een trapsgewijze teststrategie waarbij alle bestaande informatie over een teststof in een bepaalde volgorde wordt herbezien aan de hand van een proces op basis van bewijskracht op elke trap om te bepalen of er voldoende informatie beschikbaar is voor een beslissing tot gevarenclassificatie, vooraleer wordt overgegaan tot de volgende trap. Indien het irritatiepotentieel van een teststof kan worden bepaald op basis van de bestaande informatie, dan zijn bijkomende tests niet vereist. Indien het irritatiepotentieel van een teststof niet kan worden bepaald op basis van de bestaande informatie, dan wordt een trapsgewijze sequentiële testprocedure op dieren uitgevoerd tot een ondubbelzinnige indeling mogelijk is.

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

VN-GHS/CLP-categorie 1: zie „Ernstig oogletsel”.

VN-GHS/CLP-categorie 2: zie „Oogirritatie”.

VN-GHS/CLP Geen categorie: chemische stoffen die niet worden ingedeeld in VN-GHS/CLP-categorie 1 of 2 (2A of 2B).

B.69 TESTMETHODE MET GERECONSTRUEERD MODEL VAN MENSELIJK HOORNVLIESEPITHEEL VOOR DE IDENTIFICATIE VAN CHEMISCHE STOFFEN WAARVOOR CLASSIFICATIE EN ETIKETTERING VOOR OOGIRRITATIE OF ERNSTIG OOGLETSEL NIET NODIG IS

INLEIDING

1. Deze testmethode (TM) is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 492 (2017) van de OESO. Onder *ernstig oogletsel* wordt verstaan weefselbeschadiging in het oog of een ernstige fysieke gezichtsvermindering na het aanbrengen van een teststof op het oppervlak aan de voorzijde van het oog, die binnen 21 dagen na het aanbrengen niet volledig omkeerbaar is, zoals gedefinieerd door het mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, GHS) van de Verenigde Naties (VN) (1) en Verordening (EU) nr. 1272/2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels (CLP-verordening) (1). Eveneens volgens het VN-GHS en de CLP wordt onder *oogirritatie* verstaan veranderingen in het oog na het aanbrengen van een teststof op het oppervlak aan de voorzijde van het oog, die binnen 21 dagen na het aanbrengen volledig omkeerbaar zijn. Teststoffen die ernstig oogletsel veroorzaken worden ingedeeld in VN-GHS/CLP-categorie 1, terwijl teststoffen die oogirritatie veroorzaken, worden ingedeeld in VN-GHS/CLP-categorie 2. Teststoffen die niet zijn geassocieerd met oogirritatie of ernstig oogletsel, worden gedefinieerd als chemische stoffen die niet voldoen aan de voorwaarden voor indeling in VN-GHS/CLP-categorie 1 of 2 (2A of 2B), d.w.z. er wordt naar verwezen als VN-GHS/CLP Geen categorie.
2. De bepaling van ernstig oogletsel/oogirritatie ging meestal gepaard met het gebruik van proefdieren (TM B.5 (2)). Bij de keuze van de meest geschikte testmethode en het gebruik van deze testmethode moet de OESO-leidraad voor een geïntegreerde test- en beoordelingsbenadering (Integrated Approach on Testing and Assessment, IATA) voor ernstig oogletsel en oogirritatie worden gevolgd (39).
3. In deze testmethode wordt een in-vitroprocedure beschreven voor het identificeren van chemische stoffen (stoffen en mengsels) waarvoor classificatie en etikettering voor oogirritatie of ernstig oogletsel volgens het VN-GHS en de CLP niet nodig is. Bij deze procedure wordt gebruikgemaakt van een gereconstrueerd model van menselijk hoornvliesepitheel (reconstructed human cornea-like epithelium, RhCE), dat nauwe overeenkomsten heeft met de histologische, morfologische, biochemische en fysiologische eigenschappen van menselijk hoornvliesepitheel. Er zijn voor ernstig oogletsel/oogirritatie als eindpunt voor de menselijke gezondheid nog vier andere in-vitrotestmethoden gevalideerd, wetenschappelijk geldig bevonden en goedgekeurd als TM B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) en B.68 (6).
4. In deze testmethode zijn twee gevalideerde tests met in de handel verkrijgbare RhCE-modellen opgenomen. Er zijn voor de beoordeling van oogirritatie/ernstig oogletsel valideringsstudies verricht (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) met de EpiOcular™-oogirritatietest (Eye Irritation Test, EIT) en de SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) EIT. Bij elk van deze tests worden in de handel verkrijgbare RhCE-weefselpreparaten als testsysteem gebruikt. Ze worden hierna aangeduid als de Validated Reference Methods – respectievelijk VRM1 en VRM2. Op basis van de valideringsstudies en de onafhankelijke beoordeling daarvan door vakgenoten (9) (12) werd geconcludeerd dat de EpiOcular™ EIT en de SkinEthic™ HCE EIT chemische stoffen (zowel stoffen als mengsels) waarvoor classificatie en etikettering voor oogirritatie of ernstig oogletsel volgens het VN-GHS niet nodig is, correct kunnen identificeren, en werden de tests aanbevolen als wetenschappelijk geldig voor dat doel (13).
5. Op dit moment wordt algemeen aangenomen dat er in de nabije toekomst geen in-vitrotestmethode zal komen die op zichzelf de in-vivo-Draize-oogtest (2) (14) volledig zal kunnen vervangen om voorspellingen te doen voor het volledige responsbereik voor ernstig oogletsel of oogirritatie voor verschillende klassen chemische stoffen. Strategische combinaties van meerdere alternatieve testmethoden binnen (trapsgewijze) teststrategieën zoals de bottom-up/top-downbenadering kunnen de Draize-oogtest mogelijk echter wel volledig vervangen (15). De bottom-upbenadering (15) is bedoeld om te worden gebruikt wanneer op basis van bestaande informatie verwacht wordt dat een chemische stof onvoldoende oogirritatie zal veroorzaken om classificatie noodzakelijk te maken, terwijl de top-downbenadering (15) bedoeld is om te worden gebruikt wanneer op basis van bestaande informatie verwacht wordt dat een chemische stof ernstig oogletsel veroorzaakt. De EpiOcular™ EIT en de SkinEthic™ HCE EIT worden aanbevolen voor het zonder verdere tests identificeren van chemische stoffen waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is, volgens VN-GHS/CLP Geen categorie, in het kader van een teststrategie zoals de door Scott *et al.* bv. voorgestelde bottom-up/top-downbenadering, bijvoorbeeld als eerste stap in een bottom-upbenadering of als een van de laatste stappen in een top-downbenadering (15). De EpiOcular™ EIT en de SkinEthic™ HCE EIT zijn echter niet bedoeld om onderscheid te maken tussen VN-GHS/CLP-categorie 1 (ernstig oogletsel) en VN-GHS/CLP-categorie 2 (oogirritatie). Dit onderscheid zal door een andere trap van een teststrategie moeten worden gemaakt (15). Wanneer een teststof die met de EpiOcular™ EIT of de SkinEthic™ HCE EIT wordt geïdentificeerd als stof die moet worden geassocieerd met oogirritatie/ernstig oogletsel, moeten er dus nog aanvullende

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

tests (in vitro en/of in vivo) worden uitgevoerd om tot een definitieve conclusie te komen VN-GHS/CLP Geen categorie, -categorie 2 of -categorie 1), met behulp van bv. TM B.47, B.48, B.61 of B.68.

6. Deze testmethode is bedoeld om de procedure te beschrijven die wordt gebruikt om het mogelijke gevaar van een teststof voor de ogen te beoordelen op basis van het vermogen van deze chemische stof om cytotoxiciteit te veroorzaken in een RhCE-weefselpreparaat, zoals gemeten met de MTT-test (16) (zie punt 21). De levensvatbaarheid van het RhCE-weefsel na blootstelling aan een teststof wordt bepaald in vergelijking met weefsels die met de negatievecontrolestof zijn behandeld (% levensvatbaarheid), en wordt vervolgens gebruikt om het mogelijke gevaar van de teststof voor de ogen te voorspellen.
7. Er zijn prestatienormen beschikbaar (17) om de validering van nieuwe of gewijzigde, op RhCE gebaseerde in-vitro-tests die vergelijkbaar zijn met de EpiOcular™ EIT en de SkinEthic™ HCE EIT, te vergemakkelijken volgens de beginselen van OESO-leidraad nr. 34 (18) en tijdige wijziging van OESO-TG 492 met het oog op de opname van dergelijke testmethoden mogelijk te maken. De wederzijdse aanvaarding van gegevens in overeenstemming met de OESO-overeenkomst is enkel gewaarborgd voor tests die zijn gevalideerd volgens de prestatienormen, voor zover die tests door de OESO zijn geëvalueerd en zijn opgenomen in de overeenkomstige testrichtlijn.

DEFINITIES

8. Definities worden gegeven in aanhangsel 1.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

9. Deze testmethode is gebaseerd op in de handel verkrijgbare, driedimensionale RhCE-weefselpreparaten die worden vervaardigd op basis van hetzij primaire menselijke epidermiskeratinocyten (d.w.z. EpiOcular™ OCL-200) of geïmmortaliseerde menselijke hoornvliesepitheelcellen (d.w.z. SkinEthic™ HCE/S). De EpiOcular™ OCL-200 en de SkinEthic™ HCE/S RhCE-weefselpreparaten zijn vergelijkbaar met de driedimensionale in-vivostructuur van hoornvliesepitheel en worden vervaardigd op basis van cellen van de doelsoort (19) (20). Bovendien meten de tests rechtstreeks de cytotoxiciteit als gevolg van de penetratie van de chemische stof door het hoornvlies en de veroorzaking van cel- en weefselschade; deze cytotoxische reactie is bepalend voor de algemene uitkomst voor ernstige oogletsel/oogirritatie in vivo. Er zijn verscheidene werkingsmechanismen waardoor celbeschadiging kan optreden (zie punt 20), maar cytotoxiciteit speelt een belangrijke, zo niet de voornaamste, mechanistische rol die bepalend is voor de algemene respons van een chemische stof als het gaat om ernstig oogletsel/oogirritatie. Deze manifesteert zich in vivo voornamelijk als vertroebeling van het hoornvlies, iritis, conjunctivale roodheid en/of conjunctivale chemosis, ongeacht de fysisch-chemische processen die de weefselschade veroorzaken.
10. In de valideringsstudie die aan deze testmethode ten grondslag ligt, is een breed spectrum aan chemische stoffen getest, die vele verschillende stoftypen, chemische klassen, molecuulgewichten, LogP's, chemische structuren enz. vertegenwoordigen. De valideringsdatabank van de EpiOcular™ EIT bevatte in totaal 113 chemische stoffen, die volgens een analyse met de QSAR-toolbox van de OESO 95 verschillende organische functionele groepen bestreken (8). De meeste van deze chemische stoffen waren stoffen die uit één component bestaan, maar er werden ook stoffen die uit meerdere componenten bestaan, (waaronder 3 homopolymeren, 5 copolymeren en 10 quasilpolymeren) in de studie opgenomen. Wat fysische toestand en VN-GHS/CLP-categorieën betreft, waren de 113 geteste chemische stoffen als volgt verdeeld: 13 categorie 1-vloeistoffen, 15 categorie 1-vaste stoffen, 6 categorie 2A-vloeistoffen, 10 categorie 2A-vaste stoffen, 7 categorie 2B-vloeistoffen, 7 categorie 2B-vaste stoffen, 27 Geen categorie-vloeistoffen en 28 Geen categorie-vaste stoffen (8). De valideringsdatabank van de SkinEthic™ HCE EIT bevatte in totaal 200 chemische stoffen, die 165 verschillende organische functionele groepen bestreken (8) (10) (11). De meeste van deze chemische stoffen waren stoffen die uit één component bestaan, maar er werden ook stoffen die uit meerdere componenten bestaan, (waaronder 10 polymeren) in de studie opgenomen. Wat fysische toestand en VN-GHS/CLP-categorieën betreft, waren de 200 geteste chemische stoffen als volgt verdeeld: 27 categorie 1-vloeistoffen, 24 categorie 1-vaste stoffen, 19 categorie 2A-vloeistoffen, 10 categorie 2A-vaste stoffen, 9 categorie 2B-vloeistoffen, 8 categorie 2B-vaste stoffen, 50 Geen categorie-vloeistoffen en 53 Geen categorie-vaste stoffen (10) (11).

11. Deze testmethode is van toepassing op stoffen en mengsels, en op vaste stoffen, vloeibare stoffen, halfvaste stoffen en wassen. Vloeistoffen mogen waterig of niet-waterig zijn; vaste stoffen mogen al dan niet in water oplosbaar zijn. Waar mogelijk moeten vaste stoffen tot een fijn poeder worden vermalen voordat ze worden aangebracht; verdere voorbehandeling van het monster is niet nodig. Gassen en aerosolen zijn niet gevalideerd in een valideringsstudie. Hoewel het denkbaar is dat deze met behulp van RhCE-technologie kunnen worden getest, staat de huidige testmethode het testen van gassen en aerosolen niet toe.
12. Teststoffen die (van nature of na behandeling) licht absorberen in hetzelfde bereik als MTT-formazan, en teststoffen die de vitale kleurstof MTT rechtstreeks kunnen reduceren (tot MTT-formazan), kunnen de metingen van de levensvatbaarheid van het weefsel verstoren, zodat het bij deze stoffen nodig is om aangepaste controles te gebruiken met het oog op correcties. Wat voor aangepaste controles er eventueel nodig zijn hangt af van het soort verstoring door de teststof en de procedure die wordt gebruikt voor het kwantificeren van MTT-formazan (zie punten 36-42).
13. De resultaten van de prevalideringsstudies (21) (22) en de volledige valideringsstudies (8) (10) (11) hebben uitgewezen dat EpiOcular™ EIT en SkinEthic™ HCE EIT beide overdraagbaar zijn naar laboratoria die kunnen worden beschouwd als zonder enige ervaring met het uitvoeren van de bepalingen, en ook reproduceerbaar zijn binnen één laboratorium en tussen laboratoria. Uit deze studies komt naar voren dat voor EpiOcular™ EIT de mate van reproduceerbaarheid wat betreft de concordantie van voorspellingen die kan worden verwacht op basis van de gegevens over 113 chemische stoffen, in de orde van grootte van 95 % ligt binnen laboratoria en 93 % tussen laboratoria. Voor SkinEthic™ HCE EIT ligt de mate van reproduceerbaarheid wat betreft de concordantie van voorspellingen die kan worden verwacht op basis van de gegevens over 120 chemische stoffen, in de orde van grootte van 92 % binnen laboratoria en 95 % tussen laboratoria.
14. De EpiOcular™ EIT kan ook worden gebruikt om chemische stoffen te identificeren die niet hoeven te worden ingedeeld voor oogirritatie of ernstig oogletsel volgens het VN-GHS/CLP-classificatiesysteem. In het licht van de gegevens die zijn verkregen in de valideringsstudie (8), heeft de EpiOcular™ EIT een algemene nauwkeurigheid van 80 % (op basis van 112 chemische stoffen), een gevoeligheid van 96 % (op basis van 57 chemische stoffen), een percentage vals-negatieve uitslagen van 4 % (op basis van 57 chemische stoffen), een specificiteit van 63 % (op basis van 55 chemische stoffen) en een percentage vals-positieve uitslagen van 37 % (op basis van 55 chemische stoffen), in vergelijking met de referentiegegevens verkregen met de in-vivo-oogtest bij konijnen (TM B.5) (2) (14) en ingedeeld volgens het VN-GHS/CLP-classificatiesysteem. In een studie waarin 97 vloeibare agrochemische formuleringen werden getest met de EpiOcular™ EIT, bleek het prestatieniveau van de testmethode voor dit type mengsels vergelijkbaar ten opzichte van de valideringsstudie (23). De 97 formuleringen waren als volgt verdeeld: 21 categorie 1, 19 categorie 2A, 14 categorie 2B en 43 Geen categorie, ingedeeld volgens het VN-GHS/CLP-classificatiesysteem op basis van referentiegegevens verkregen met de in-vivo-oogtest bij konijnen (TM B.5) (2) (14). De algemene nauwkeurigheid was 82 % (op basis van 97 formuleringen), de gevoeligheid 91 % (op basis van 54 formuleringen), het percentage vals-negatieve uitslagen 9 % (op basis van 54 formuleringen), de specificiteit 72 % (op basis van 43 formuleringen) en het percentage vals-positieve uitslagen 28 % (op basis van 43 formuleringen) (23).
15. De SkinEthic™ HCE EIT kan ook worden gebruikt om chemische stoffen te identificeren die niet hoeven te worden ingedeeld voor oogirritatie of ernstig oogletsel volgens het VN-GHS/CLP-classificatiesysteem. In het licht van de gegevens die zijn verkregen in de valideringsstudie (10) (11), heeft de SkinEthic™ HCE EIT een algemene nauwkeurigheid van 84 % (op basis van 200 chemische stoffen), een gevoeligheid van 95 % (op basis van 97 chemische stoffen), een percentage vals-negatieve uitslagen van 5 % (op basis van 97 chemische stoffen), een specificiteit van 72 % (op basis van 103 chemische stoffen) en een percentage vals-positieve uitslagen van 28 % (op basis van 103 chemische stoffen), in vergelijking met de referentiegegevens verkregen met de in-vivo-oogtest bij konijnen (TM B.5) (2) (14) en ingedeeld volgens het VN-GHS/CLP-classificatiesysteem.
16. De percentages vals-negatieve uitslagen die met beide RhCE-tests werden verkregen voor stoffen of mengsels, vallen binnen de algemene waarschijnlijkheid van 12 % dat stoffen in herhaalde tests met de in-vivo-Draize-oogtest als VN-GHS/CLP-categorie 2 of als VN-GHS/CLP Geen categorie worden geïdentificeerd; dit is het gevolg van de inherente intertestvariabiliteit van de methode (24). De percentages vals-positieve uitslagen die met beide RhCE-tests werden

verkregen voor stoffen of mengsels, zijn niet kritiek in deze context van deze testmethode, omdat voor alle teststoffen die een weefsellevensvatbaarheid opleveren die gelijk is aan of lager dan de vastgestelde grenswaarden (zie punt 44), aanvullende tests zullen moeten worden uitgevoerd met andere in-vitrotestmethoden of als laatste optie met konijnen, afhankelijk van de wettelijke voorschriften, volgens een sequentiële teststrategie en op bewijskracht gebaseerde aanpakken. Deze testmethoden kunnen worden gebruikt voor alle soorten chemische stoffen, waarbij een negatief resultaat moet worden aangenomen om een chemische stof niet in te delen voor oogirritatie en ernstig oogletsel (VN-GHS/CLP Geen categorie). Voordat de EpiOcular™ EIT en de SkinEthic™ HCE EIT worden gebruikt in een bottom-upbenadering volgens andere classificatiesystemen dan het VN-GHS/CLP-systeem, moeten de toepasselijke regelgevingsinstanties worden geraadpleegd.

17. Aan deze testmethode kleeft de beperking dat ze geen onderscheid kan maken tussen oogirritatie/omkeerbare effecten op ogen (categorie 2) en ernstig oogletsel/onomkeerbare effecten op ogen (categorie 1) zoals gedefinieerd door het VN-GHS en de CLP, noch tussen stoffen die irriterend zijn voor het oog (optionele categorie 2A), en stoffen die mild irriterend zijn voor het oog (optionele categorie 2B), zoals gedefinieerd door het VN-GHS (1). Hiervoor zijn verdere tests met andere in-vitrotestmethoden nodig.
18. De term „teststof” wordt in deze teststof gebruikt om te verwijzen naar datgene dat wordt getest ⁽²⁾, en houdt geen verband met de toepasselijkheid van de RhCE-testmethode op het testen van stoffen en/of mengsels.

PRINCIPE VAN DE TEST

19. De teststof wordt plaatselijk aangebracht op ten minste twee driedimensionale RhE-weefselpreparaten en na de blootstelling en een incubatieperiode na de behandeling wordt de weefsellevensvatbaarheid gemeten. De RhCE-weefsels worden gereconstrueerd uit primaire menselijke epidermiskeratinocyten of geïmmortaliseerde menselijke hoornvliesepitheelcellen, die meerdere dagen zijn gekweekt tot gelaagd, hooggedifferentieerd plaveiselcelepitheel dat morfologisch vergelijkbaar is met het epitheel in het menselijk hoornvlies. Het EpiOcular™ RhCE-weefselpreparaat bestaat uit ten minste 3 levensvatbare cellagen en een niet-gekeratiniseerd oppervlak, met een hoornvliesachtige structuur analoog aan die in vivo wordt aangetroffen. Het SkinEthic™ HCE RhCE-weefselpreparaat bestaat uit ten minste 4 levensvatbare cellagen, bestaande uit cilindrische basaalcellen, tussenliggende wingcellen en plaveiselcellen aan de oppervlakte, vergelijkbaar met de opbouw van normaal menselijk hoornvliesepitheel (20) (26).
20. Door chemische stoffen geïnduceerd(e) ernstig oogletsel/oogirritatie dat/die zich voornamelijk in vivo manifesteert als vertroebeling van het hoornvlies, iritis, conjunctivale roodheid en/of conjunctivale chemosis, is het gevolg van een cascade van gebeurtenissen, beginnend met de penetratie van de chemische stoffen door het hoornvlies en/of de conjunctiva en de veroorzaking van schade aan de cellen. Er zijn verscheidene werkingsmechanismen waardoor celbeschadiging kan optreden, waaronder: lysis van de celmembranen (bv. door oppervlakteactieve stoffen, organische oplosmiddelen); coagulatie van macromoleculen (vooral eiwitten) (bv. door oppervlakteactieve stoffen, organische oplosmiddelen, alkaliën en zuren); verzeeping van lipiden (bv. door alkaliën); en alkylering of andere covalente interacties met macromoleculen (bv. door bleekmiddelen, peroxiden en alkylatoren (15) (27) (28)). Er is evenwel aangetoond dat cytotoxiciteit een belangrijke, zo niet de voornaamste, mechanistische rol speelt, die bepalend is voor de algemene respons van een chemische stof als het gaat om ernstig oogletsel/oogirritatie, ongeacht de fysisch-chemische processen die de wefelschade veroorzaken (29) (30). Bovendien wordt het potentieel van een chemische stof voor ernstig oogletsel/oogirritatie hoofdzakelijk bepaald door de omvang van het aanvankelijke letsel (31), dat gecorreleerd is met de mate van celdood (29) en met de omvang van de erop volgende reacties en de uiteindelijke gevolgen (32). Licht irriterende stoffen hebben dus alleen een uitwerking op het oppervlak van het hoornvliesepitheel, mild en matig irriterende stoffen veroorzaken voornamelijk schade aan het epitheel en het oppervlakkige stroma, en hevig irriterende stoffen brengen schade toe aan het epitheel, het diepe stroma en soms het hoornvliesendotheel (30) (33). De levensvatbaarheid van het RhCE-weefselpreparaat na plaatselijke blootstelling aan een teststof voor het identificeren van chemische stoffen waarvoor classificatie voor ernstig oogletsel/oogirritatie niet nodig is (VN-GHS/CLP Geen categorie), wordt gemeten op basis van de aanname dat alle chemische stoffen die ernstig oogletsel of oogirritatie veroorzaken cytotoxiciteit zullen veroorzaken in het hoornvliesepitheel en/of de conjunctiva.

⁽²⁾ In juni 2013 heeft de gezamenlijke vergadering van de OESO besloten dat er in nieuwe en bijgewerkte OESO-testrichtlijnen waar mogelijk consequenter gebruikgemaakt moet worden van de term „teststof” om te beschrijven wat er getest wordt.

21. De RhCE-weefsellevensvatbaarheid wordt gemeten aan de hand van de klassieke methode van enzymatische omzetting van de vitale kleurstof MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromide; thiazolylblauw tetrazoliumbromide; CAS-nummer 298-93-1] door de levensvatbare cellen van het weefsel in een blauw MTT-formaanzout dat kwantitatief wordt gemeten na extractie uit weefsels (16). Chemische stoffen waarvoor classificatie en etikettering volgens VN-GHS/CLP niet nodig is (Geen categorie), worden geïdentificeerd als stoffen die de weefsellevensvatbaarheid niet tot onder een bepaalde drempelwaarde verlagen (d.w.z. weefsellevensvatbaarheid > 60 % in EpiOcular™ EIT en SkinEthic™ HCE EITL⁽³⁾), of > 50 % in SkinEthic™ HCE EITS⁽⁴⁾) (zie punt 44).

AANTONING VAN BEKWAAMHEID

22. Voordat de RhCE-tests routinematig worden gebruikt met het oog op regelgeving, moeten laboratoria hun technische bekwaamheid aantonen door een correcte voorspelling te doen voor de vijftien in tabel 1 aanbevolen chemische stoffen voor bekwaamheidstoetsing. Het betreft een selectie uit de chemische stoffen die werden gebruikt in de valideringsstudies van de VRM's (8) (10) (11). Voor zover mogelijk omvat de selectie chemische stoffen die: i) verschillende fysische toestanden bestrijken; ii) het volledige responsbereik voor ernstig oogletsel of oogirritatie bestrijken op basis van resultaten van zeer goede kwaliteit die zijn verkregen in de referentie-in-vivo-oogtest bij konijnen (TM B.5) (2) (14), het VN-GHS-classificatiesysteem (d.w.z. categorieën 1, 2A, 2B en Geen categorie) (1) en het CLP-classificatiesysteem (d.w.z. categorieën 1, 2 en Geen categorie); iii) de uiteenlopende in-vivoclassificatiecriteria bestrijken (24) (25); iv) representatief zijn voor de chemische klassen die in de valideringsstudie zijn gebruikt (8) (10) (11); v) een breed en representatief spectrum van organische functionele groepen bestrijken (8) (10) (11); vi) een goed omschreven chemische structuur hebben (8) (10) (11); vii) gekleurd zijn en/of rechtstreeks MTT reduceren; viii) tijdens de validering van de RhCE-testmethoden reproduceerbare resultaten opleverden; ix) tijdens de validering van de RhCE-testmethoden correct werden ingedeeld door deze tests; x) het volledige in-vitroresponsbereik bestrijken op basis van referentiegegevens voor de RhCE-testmethoden van zeer goede kwaliteit (0 tot 100 % levensvatbaarheid); xi) in de handel verkrijgbaar zijn, en waaraan xii) geen buitensporige aanschaf- en/of verwijderingskosten verbonden zijn. In situaties waarin een chemische stof in de lijst niet beschikbaar is of om andere gerechtvaardigde redenen niet kan worden gebruikt, mag een andere chemische stof worden gebruikt, mits deze aan de bovenstaande criteria voldoet, bv. een van de andere chemische stoffen die bij de validering van de VRM zijn gebruikt. Dergelijke afwijkingen moeten echter wel worden verantwoord.

Tabel 1

Lijst van chemische stoffen voor bekwaamheidstoetsing

Chemische benaming	CAS RN	Organische functionele groepen ⁽¹⁾	Fysische toestand	VRM1-levensvatbaarheid (%) ⁽²⁾	VRM2-levensvatbaarheid (%) ⁽³⁾	VRM-voorspelling	MTT-reducerende stof	Kleurinterf.
Categorie 1 in vivo⁽⁴⁾								
Methylthioglycolaat	2365-48-2	Carbonzuurester; Thioalcohol	Vloeistof	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	Er kan geen voorspelling worden gedaan	J (sterk)	N
Hydroxyethylacrylaat	818-61-1	Acrylaat; Alcohol	Vloeistof	7,5 ± 4,7 ⁽⁵⁾	1,6 ± 1,0	Er kan geen voorspelling worden gedaan	N	N
2,5-Dimethyl-2,5-hexaandiol	110-03-2	Alcohol	Vastestof	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	Er kan geen voorspelling worden gedaan	N	N
Natriumoxalaat	62-76-0	Oxocarbonzuur	Vastestof	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	Er kan geen voorspelling worden gedaan	N	N
Categorie 2A in vivo⁽⁴⁾								
2,4,11,13-Tetraäzetetradecaan-diiimidamide, N,N''-bis(4-chloorfenyl)-3,12-diimino-, di-D-gluconaat (20 %, waterig) ⁽⁶⁾	18472-51-0	Aromatische heterocyclische halide; Arylhalogenide; Dihydroxylgroep; Guanidine	Vloeistof	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	Er kan geen voorspelling worden gedaan	N	J (zwak)

⁽³⁾ EITL: EIT voor vloeistoffen in het geval van SkinEthic™ HCE.⁽⁴⁾ EITS: EIT voor vaste stoffen in het geval van SkinEthic™ HCE.

Chemische benaming	CAS RN	Organische functionele groepen ⁽¹⁾	Fysische toestand	VRM1-levensvatbaarheid (%) ⁽²⁾	VRM2-levensvatbaarheid (%) ⁽³⁾	VRM-voorspelling	MTT-reducerende stof	Kleur-interf.
Natriumbenzoaat	532-32-1	Aryl; Carbonzuur	Vaste stof	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	Er kan geen voorspelling worden gedaan	N	N

Categorie 2B in vivo ⁽⁴⁾

Diëthyltoluamide	134-62-3	Benzamide	Vloeistof	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	Er kan geen voorspelling worden gedaan	N	N
2,2-Dimethyl-3-methyleenbicyclo[2.2.1]heptaan	79-92-5	Alkaan, vertakt met tertiaire koolstof; Alkeen; Bicycloheptaan; Gebrugde koolstofringen; Cycloalkaan	Vaste stof	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	Er kan geen voorspelling worden gedaan	N	N

Geen categorie in vivo ⁽⁴⁾

1-Ethyl-3-methylimidazoliummethylsulfaat	342573-75-5	Alkoxy; Ammoniumzout; Aryl; Imidazool; Sulfaat	Vloeistof	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Geen categorie	N	N
Dicaprylylether	629-82-3	Alkoxy; Ether	Vloeistof	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Geen categorie	N	N
Piperonylbutoxide	51-03-6	Alkoxy; Benzodioxool; Benzyl; Ether	Vloeistof	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Geen categorie	N	N
Polyethyleenglycol (PEG-40) gehydrogeneerde ricinusolie	61788-85-0	Acylal; Alcohol; Allyl; Ether	Viskeus	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Geen categorie	N	N
1-(4-Chloorfenyl)-3-(3,4-dichloorfenyl)ureum	101-20-2	Aromatische heterocyclische halide; Arylhalogenide; Ureumderivat	Vaste stof	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	Geen categorie	N	N
2,2'-Methyleenbis(6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)fenol)	103597-45-1	Alkaan, vertakt met quaternaire koolstof; Gefuseerde carbocyclische aromaat; Gefuseerde verzadigde heterocyclische verbinding; Chinoïdeprecursor; tert-Butylester	Vaste stof	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	Geen categorie	N	N

Chemische benaming	CAS RN	Organische functionele groepen ⁽¹⁾	Fysische toestand	VRM1-levensvatbaarheid (%) ⁽²⁾	VRM2-levensvatbaarheid (%) ⁽³⁾	VRM-voorspelling	MTT-reducerende stof	Kleurinterf.
Kaliumtetrafluorboraat	14075-53-7	Anorganisch zout	Vaste stof	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Geen categorie	N	N

Afkortingen:

CAS RN = registratienummer van de Chemical Abstract Service; VN-GHS = mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen (1); VRM1 = gevalideerde referentiemethode 1, EpiOcular™ EIT; VRM2 = gevalideerde referentiemethode 2, SkinEthic™ HCE EIT; Kleurinterf. = kleurinterferentie met de standaard extinciemeting (optische dichtheid (OD)) van MTT-formazan.

⁽¹⁾ Organische functionele groep toegekend volgens een geneste analyse met OESO-toolbox 3.1 (8).

⁽²⁾ Op basis van resultaten verkregen met de EpiOcular™ EIT in de oogirritatievalideringsstudie (Eye Irritation Validation Study, EIVS) van het EURL CEVMA/Cosmetics Europe (8).

⁽³⁾ Op basis van resultaten verkregen met de SkinEthic™ HCE EIT in de valideringsstudie (10) (11).

⁽⁴⁾ Gebaseerd op de resultaten van de in-vivo-oogtest op konijnen (TM B.5/OESO TG 405) (2) (14) en aan de hand van het VN-GHS.

⁽⁵⁾ Op basis van resultaten verkregen in het teststrategie-onderzoek van het CEFIC Consortium for *in vitro* Eye Irritation testing strategy (CON4EI).

⁽⁶⁾ Indeling in categorie 2A of 2B hangt af van de interpretatie van het VN-GHS-criterium voor het onderscheiden van deze twee categorieën, d.w.z. 1 van de 3 versus 2 van de 3 dieren met effecten op dag 7 nodig voor indeling in categorie 2A. Het in-vivo-onderzoek omvatte 3 dieren. Alle eindpunten behalve vertroebeling van het hoornvlies in één dier herstelden tot een score van nul op dag 7 of eerder. Het ene dier dat op dag 7 niet volledig was hersteld, had een score van 1 (op dag 7) voor de vertroebeling van het hoornvlies, die volledig was hersteld op dag 9.

23. Als onderdeel van deze bekwaamheidstoetsing wordt aanbevolen dat de gebruikers na ontvangst de door de fabrikant van het RhCE-weefselpreparaat gespecificeerde barrière-eigenschappen van de weefsels verifiëren (zie de punten 25, 27 en 30). Dit is in het bijzonder van belang indien weefsels over lange afstanden/gedurende lange perioden zijn vervoerd. Zodra een test met succes is opgezet en de bekwaamheid in het gebruik ervan is verworven en aangetoond, behoeft een dergelijke verificatie niet routinematig te worden uitgevoerd. Echter, indien een test routinematig wordt gebruikt, wordt aanbevolen om de barrière-eigenschappen op regelmatige basis te blijven toetsen.

PROCEDURE

24. De tests die op dit moment onder deze testmethode vallen, zijn de wetenschappelijk geldige EpiOcular™ EIT en SkinEthic™ HCE EIT (9) (12) (13), aangeduid als de Validated Reference Methods (respectievelijk VRM1 en VRM2). De standaardwerkwijzen voor de RhCE-tests zijn beschikbaar en dienen te worden gevolgd wanneer de tests in een laboratorium wordt toegepast en gebruikt (34) (35). In de volgende punten en aanhangsel 2 worden de belangrijkste onderdelen en procedures van de RhCE-tests beschreven.

COMPONENTEN VAN DE RHCE-TESTMETHODE

Algemene voorwaarden

25. Voor het reconstrueren van het driedimensionale model van hoornvliesepitheelcellen moeten relevante, uit mensen verkregen cellen worden gebruikt. Het model moet worden opgebouwd uit lagen van naar het oppervlak geleidelijk plattere cellen, maar zonder verhoorde cellen. Het RhCE-weefselpreparaat wordt bereid op inzetstukken met een poreus synthetisch membraan dat voedingsstoffen doorlaat naar de cellen. Er moeten in het gereconstrueerde hoornvliesepitheelmodel meerdere lagen van levensvatbare, niet gekeratiniseerde epitheelcellen aanwezig zijn. Het oppervlak van het RhCE-weefselpreparaat moet in rechtstreeks contact staan met de lucht, zodat het rechtstreeks kan worden blootgesteld aan de teststoffen op een manier die vergelijkbaar is met blootstelling van hoornvliesepitheel in vivo. Het RhCE-weefselpreparaat moet een functionele barrière vormen die voldoende robuust is om bestand te zijn tegen snelle penetratie van cytotoxische ijkstoffen, bv. Triton X-100 of natriumdodecylsulfaat (SDS). De barrierefunctie moet worden aangetoond en kan worden beoordeeld door de blootstellingstijd te bepalen die nodig is om de wefsellevensvatbaarheid met 50 % te doen dalen (ET₅₀) bij aanbrenging van de ijkstof in een bepaalde, vaste concentratie (bv. 100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100), of door de concentratie te bepalen waarin een ijkstof de wefsellevensvatbaarheid met 50 % doet dalen (IC₅₀) na een vaste blootstellingstijd (bv. 30 minuten behandeling met 50 µl SDS) (zie punt 30). De omsluitingseigenschappen van het RhCE-weefselpreparaat moeten voorkomen dat teststof om de rand van het levensvatbare weefsel heen het levende weefsel kan bereiken. Dat zou een slecht model voor hoornvliesblootstelling kunnen opleveren. De bij mensen verkregen cellen die worden gebruikt om het RhCE-weefselpreparaat op te bouwen, mogen niet verontreinigd zijn met bacteriën, virussen, mycoplasma of schimmels. De leverancier moet controleren of het weefselpreparaat steriel is en niet verontreinigd is met schimmels of bacteriën.

Functionele voorwaarden

Levensvatbaarheid

26. De levensvatbaarheid van het weefsel wordt gekwantificeerd door middel van de MTT-test (16). De levensvatbare cellen van het RhCE-weefselpreparaat reduceren de vitale kleurstof MTT tot een blauw MTT-formazanprecipitaat, dat vervolgens met isopropanol (of een vergelijkbaar oplosmiddel) uit het weefsel wordt geëxtraheerd. Het geëxtraheerde

MTT-formazan kan worden gekwantificeerd met behulp van hetzij een standaard extinctiemeting (meting van de optische dichtheid (OD)) of een HPLC/UPLC-spectrofotometrieprocedure (36). De OD van het extractieoplosmiddel alleen moet voldoende klein zijn, d.w.z. $OD < 0,1$. Gebruikers van het RhCE-weefselpreparaat moeten waarborgen dat iedere gebruikte batch van het RhCE-weefselpreparaat voldoet aan gedefinieerde criteria voor de negatieve controle. In tabel 2 worden de aanvaardbaarheidsbereiken voor de OD-waarden in negatieve controle voor de VRM's gegeven. Bij gebruik van HPLC/UPLC-spectrofotometrie moeten de OD-bereiken in negatieve controle in tabel 2 als aanvaardbaarheids criterium voor de negatieve controles worden gebruikt. In het testverslag moet worden gedocumenteerd dat de weefsels die zijn behandeld met de negatievecontrolestof, gedurende de volledige blootstellingsperiode van de test in cultuur stabiel zijn (een vergelijkbare gemeten weefsellevensvatbaarheid opleveren). De weefselproducent moet als onderdeel van de QC-weefselbatchvrijgave een vergelijkbare procedure uitvoeren, maar daarbij gelden mogelijk andere aanvaardbaarheids criteria dan de criteria in tabel 2. De ontwikkelaar/leverancier van een RhCE-weefselpreparaat moet een aanvaardbaarheidsbereik (boven- en ondergrens) vaststellen voor de OD-waarden in negatieve controle (onder de omstandigheden van de QC-testmethode).

Tabel 2

Aanvaardbaarheidsbereiken voor OD-waarden in negatieve controle (voor gebruikers van de test)

Test	Ondergrens aanvaardbaarheid	Bovengrens aanvaardbaarheid
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (voor protocollen voor vloeistoffen en voor vaste stoffen)	> 0,8 ⁽¹⁾	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (voor protocollen voor vloeistoffen en voor vaste stoffen)	> 1,0	≤ 2,5

(1) Voor deze aanvaardbaarheids grens is rekening gehouden met de mogelijkheid van een langere vervoers-/bewaringsduur (bv. > 4 dagen), waarvan is aangetoond dat deze geen invloed heeft op de prestaties van de testmethode (37).

Barrièrefunctie

27. Het RhCE-weefselpreparaat moet dik en robuust genoeg zijn om bestand te zijn tegen snelle penetratie van cytotoxische ijkstoffen, zoals beoordeeld aan de hand van bv. de ET_{50} (Triton X-100) of de IC_{50} (SDS). (tabel 3). Voor elke batch van het gebruikte RhCE-weefselpreparaat moet de ontwikkelaar/leverancier van het RhCE-weefselpreparaat bij levering van de weefsels aan de eindgebruiker de barrièrefunctie aantonen (zie punt 30).

Morfologie

28. Uit histologisch onderzoek van het RhCE-weefselpreparaat moet blijken dat het een vergelijkbare structuur heeft als menselijk hoornvliesepitheel (met ten minste 3 lagen van levensvatbare epitheelcellen en een niet-gekeratiniseerd oppervlak). Voor de VRM's is de door de ontwikkelaar/leverancier vastgesteld dat de weefselpreparaten een geschikte morfologie hebben, en hoeft de gebruiker van de testmethode dit dus niet zelf nogmaals voor elke gebruikte weefselbatch aan te tonen.

Reproduceerbaarheid

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

Kwaliteitscontrole (QC)

30. Het RhCE-weefselpreparaat mag alleen worden gebruikt als de ontwikkelaar/leverancier aantoont dat iedere batch van het gebruikte RhCE-weefselpreparaat voldoet aan gedefinieerde productievrijgavecriteria, waarvan die voor levensvatbaarheid (punt 26) en barrièrefunctie (zie punt 27) de meest relevante zijn. De ontwikkelaar/leverancier van een RhCE-weefselpreparaat moet een aanvaardbaarheidsbereik (boven- en ondergrens) vaststellen voor de barrièrefuncties zoals gemeten aan de hand van de ET_{50} of de IC_{50} (zie de punten 25 en 26). Het aanvaardbaarheidsbereik voor de ET_{50} en de IC_{50} dat door de ontwikkelaar/leverancier van de (in de VRM's gebruikte) RhCE-weefselpreparaten als QC-criterium voor batchvrijgave wordt gebruikt, staat in tabel 3. De ontwikkelaar/leverancier van een RhCE-weefselpreparaat moet de gebruikers van de testmethode gegevens verstrekken waaruit blijkt dat aan alle productievrijgavecriteria wordt voldaan, zodat de gebruikers deze informatie in het testverslag kunnen opnemen. Alleen resultaten die zijn verkregen met weefsels die aan alle productievrijgavecriteria voldoen, zijn aanvaardbaar voor een betrouwbare voorspelling voor chemische stoffen waarvoor classificatie en etikettering voor oogirritatie of ernstig oogletsel volgens VN-GHS/CLP niet nodig is.

Tabel 3

QC-criterium voor batchvrijgave

Test	Ondergrens aanvaardbaarheid	Bovengrens aanvaardbaarheid
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100)	IC ₅₀ = 12,2 min	IC ₅₀ = 37,5 min
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (30 minuten behandeling met 50 µl SDS)	IC ₅₀ = 1 mg/ml	IC ₅₀ = 3,2 mg/ml

Het aanbrengen van de teststof en de controlestoffen

31. Er moeten ten minste twee duploweefsels worden gebruikt voor iedere teststof en iedere controlestof in ieder experiment. Er worden twee verschillende behandelingsprotocollen gebruikt, een voor vloeibare teststoffen en een voor vaste teststoffen (34) (35). Voor beide methoden en protocollen moet het oppervlak van het weefselpreparaat worden bevochtigd met calcium- en magnesiumvrije fosfaatgebufferde zoutoplossing van Dubecco (Ca²⁺/Mg²⁺-vrije DPBS) alvorens teststoffen worden aangebracht, om de natte omstandigheden van het menselijk oog na te bootsen. De behandeling van de weefsels wordt begonnen door ze aan de teststof(fen) en controlestoffen bloot te stellen. Voor beide behandelingsprotocollen in beide VRM's moet er zo veel teststof of controlestof worden aangebracht dat het epitheeloppervlak gelijkmatig bedekt is. Er mag echter geen oneindige dosis worden gebruikt (zie de punten 32 en 33) (aanhangel 2).
32. Teststoffen die kunnen worden gepipetteerd bij temperaturen van 37 °C of lager (zo nodig met een plunjerpipet), worden in de VRM's als vloeistoffen behandeld. Zo niet, dan worden ze als vaste stoffen behandeld (zie punt 33). In de VRM's wordt een vloeibare teststof gelijkmatig over het weefseloppervlak verspreid (d.w.z. er wordt ten minste 60 µl/cm² aangebracht) (zie aanhangsel 2, (33) (34)). Om de juiste dosering op het weefsel te garanderen, moeten capillaire effecten (oppervlaktespanningseffecten) die kunnen optreden als gevolg van de geringe volumes die op het inzetstuk (op het weefseloppervlak) worden aangebracht, zo veel mogelijk worden vermeden. Met vloeibare teststoffen behandelde weefsels worden 30 min geïncubeerd onder standaard kweekomstandigheden (37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95 % RH). Aan het einde van de blootstellingsperiode moeten de vloeibare teststof en de controlestoffen zorgvuldig van het weefseloppervlak worden verwijderd door grondig te spoelen met Ca²⁺/Mg²⁺-vrije DPBS bij kamertemperatuur. Deze spoelstap wordt gevolgd door onderdompeling in vers medium bij kamertemperatuur (om alle in het weefsel geabsorbeerde teststof te verwijderen) gedurende een vooraf bepaalde tijd die varieert afhankelijk van de gebruikte VRM. Alleen bij VRM1 wordt een na-incubatie in vers medium onder standaard kweekomstandigheden toegepast, voordat de MTT-test wordt uitgevoerd (zie aanhangsel 2 (34) (35)).
33. Teststoffen die niet kunnen worden gepipetteerd bij temperaturen van 37 °C of lager, worden in de VRM's als vaste stoffen behandeld. De hoeveelheid teststof die wordt aangebracht, moet voldoende zijn om het gehele weefseloppervlak te bedekken, d.w.z. er wordt ten minste 60 mg/cm² aangebracht (aanhangel 2). Indien mogelijk moeten vaste stoffen in de vorm van een fijn poeder worden getest. Met vaste teststoffen behandelde weefsels worden gedurende een vooraf bepaalde tijd (afhankelijk van de gebruikte VRM) geïncubeerd onder standaard kweekomstandigheden (zie aanhangsel 2 (34) (35)). Aan het einde van de blootstellingsperiode moeten de vaste teststof en de controlestoffen zorgvuldig van het weefseloppervlak worden verwijderd door grondig te spoelen met Ca²⁺/Mg²⁺-vrije DPBS bij kamertemperatuur. Deze spoelstap wordt gevolgd door onderdompeling in vers medium bij kamertemperatuur (om alle in het weefsel geabsorbeerde teststof te verwijderen) gedurende een vooraf bepaalde tijd die varieert afhankelijk van de gebruikte VRM, en een na-incubatie in vers medium onder standaard kweekomstandigheden toegepast, voordat de MTT-test wordt uitgevoerd (zie aanhangsel 2 (34) (35)).

34. In elke testrun moeten gelijktijdige negatieve en positieve controles worden opgenomen om aan te tonen dat de levensvatbaarheid (bepaald met de negatieve controle) en de gevoeligheid (bepaald met de positieve controle) van de weefsels binnen de op basis van historische gegevens vastgestelde aanvaardbaarheids grenzen liggen. De gelijktijdige negatieve controle zorgt ook voor de baseline (100 % levensvatbaarheid) om het relatieve percentage levensvatbaarheid van de met de teststof behandelde weefsels te berekenen ($\% \text{Levensvatbaarheid}_{\text{test}}$). De aanbevolen positieve controlestof voor gebruik met de VRM's is zuiver methylacetaat (CAS RN 79-20-9, in de handel verkrijgbaar van bv. Sigma-Aldrich, cat. nr. 45997; vloeistof). De aanbevolen negatieve controlestoffen voor gebruik met VRM1 en VRM2 zijn respectievelijk ultrazuiver H₂O en Ca²⁺/Mg²⁺-vrije DPBS. Dit zijn de stoffen die als controlestoffen werden gebruikt in de valideringsstudies van de VRM's en waarvoor de meeste historische gegevens beschikbaar zijn. Het gebruik van geschikte alternatieve positieve- en negatieve controlestoffen moet afdoende wetenschappelijk gerechtvaardigd worden. De negatieve en positieve controles moeten volgens hetzelfde protocol/dezelfde protocollen worden getest als de teststoffen die in de testrun zijn opgenomen (d.w.z. voor vloeistoffen en/of voor vaste stoffen). Na het aanbrengen volgen de blootstelling aan de behandeling, spoelen, onderdompeling na de behandeling en na-incubatie, voor zover van toepassing, zoals beschreven voor controles die gelijktijdig met vloeibare teststoffen worden gerund (zie punt 32) of voor controles die gelijktijdig met vaste stoffen worden gerund (zie punt 33), alvorens de MTT-test wordt uitgevoerd (zie punt 35) (34) (35). Een enkele set van negatieve en positieve controles is voldoende voor alle teststoffen in dezelfde testrun die dezelfde fysische toestand hebben (vloeistoffen of vaste stoffen).

Metingen van de weefsellevensvatbaarheid

35. De MTT-omzettingstest is een gestandaardiseerde kwantitatieve methode (16), en de aangewezen methode voor het meten van de weefsellevensvatbaarheid binnen deze testmethode. De test werkt goed met geconstrueerd driedimensionaal weefsel. De MTT-test wordt onmiddellijk na de na-incubatieperiode uitgevoerd. In de VRM's wordt het RhCE-weefselpreparaat gedurende 180 ± 15 min onder standaard kweekomstandigheden in 0,3 ml 1 mg/ml MTT-oplossing geplaatst. De levensvatbare cellen van het RhCE-weefselpreparaat reduceren de vitale kleurstof MTT tot een blauw MTT-formazanprecipitaat. Het neergeslagen blauwe MTT-formazanproduct wordt vervolgens met een passend volume isopropanol (of een vergelijkbaar oplosmiddel) uit het weefsel geëxtraheerd (34) (35). Bij weefsels die worden getest met vloeibare teststoffen, moet de extractie zowel aan de bovenkant als aan de onderkant van de weefsels plaatsvinden, terwijl bij weefsels die worden getest met vaste teststoffen en gekleurde vloeistoffen, de extractie enkel aan de onderkant van het weefsel moet plaatsvinden (om de kans op verontreiniging van de isopropanol-extractieoplossing met mogelijk op het weefsel achtergebleven teststof zoveel mogelijk te verkleinen). Bij weefsels die worden getest met moeilijk afwasbare teststoffen, kan ook worden gekozen voor extractie enkel aan de onderkant. De gelijktijdig geteste negatieve en positieve controlestoffen moeten op dezelfde manier worden behandeld als de geteste chemische stof. Het geëxtraheerde MTT-formazan kan worden gekwantificeerd met behulp van een meting van de standaard extinctie (OD) bij 570 nm, bij een bandbreedte van maximaal ± 30 nm, of een HPLC/UPLC-spectrofotometrie procedure (zie punt 42) (11) (36).
36. De optische eigenschappen van de teststof of de chemische werking ervan op MTT kunnen de meting van MTT-formazan verstoren, met een foutieve bepaling van de weefsellevensvatbaarheid tot gevolg. Soms verstoren teststoffen de meting van MTT-formazan, door rechtstreekse reductie van MTT tot blauw MTT-formazan en/of door kleurinterferentie indien de teststof van nature of als gevolg van de behandelingsprocedures in hetzelfde OD-bereik absorbeert als MTT-formazan (d.w.z. rond 570 nm). Voorafgaand aan de MTT-test moeten teststoffen getoetst worden om mogelijke rechtstreekse MTT-reducerende stoffen en/of stoffen die kleurinterferentie veroorzaken, te identificeren. Om mogelijke storing door deze teststoffen te detecteren en ervoor te corrigeren moeten er aanvullende controles worden uitgevoerd (zie de punten 37-41). Dit is vooral van belang als een bepaalde teststof zich niet volledig van het RhCE-weefselpreparaat laat wassen, of als de stof in het hoornvliesepitheelmodel penetreert, en de teststof daardoor in de RhCE-weefselpreparaten aanwezig is wanneer de MTT-test wordt uitgevoerd. Voor teststoffen die (van nature of na behandeling) licht absorberen in hetzelfde bereik als MTT-formazan en niet compatibel zijn met de meting van de standaard extinctie (OD) van MTT-formazan vanwege te sterke interferentie, d.w.z. sterkte extinctie bij 570 ± 30 nm, kan wellicht een HPLC/UPLC-spectrofotometrie procedure voor het meten van MTT-formazan worden toegepast (zie de punten 41 en 42) (11) (36). Een gedetailleerde beschrijving van hoe rechtstreekse MTT-reductie kan worden gedetecteerd en hoe ervoor kan worden gecorrigeerd, is te vinden in de SOP's voor de VRM's (34) (35). Bovendien zijn in de aanhangsels III en IV illustratieve stroomschema's opgenomen voor respectievelijk VRM1 en VRM2, die als leidraad kunnen dienen voor het identificeren en behandelen van rechtstreekse MTT-reducerende stoffen en/of stoffen die kleurinterferentie veroorzaken.

37. Om na te gaan of teststoffen die (van nature of na behandeling) licht absorberen in hetzelfde bereik als MTT-formazan, de test zouden kunnen verstoren en te beslissen of er aanvullende controles nodig zijn, wordt de teststof toegevoegd aan water en/of isopropanol en voldoende tijd geïncubeerd bij kamertemperatuur (zie aanhangsel 2 (34) (35)). Als de teststof in water en/of isopropanol voldoende licht absorbeert in het bereik van 570 ± 20 nm voor VRM1 (zie aanhangsel 3) of als bij menging van de teststof met water een gekleurde oplossing wordt verkregen voor VRM2 (zie aanhangsel 4), wordt aangenomen dat de teststof de meting van de standaard extinctie (OD) van MTT-formazan verstoort en dat er hetzij extra kleurstofcontroles moeten worden uitgevoerd hetzij, als alternatief, een HPLC/UPLC-spectrofotometrieprocedure moet worden gebruikt, in welk geval deze controles niet nodig zijn (zie de punten 41 en 42) en de aanhangsels III en IV) (34) (35). Bij het uitvoeren van de meting van de standaard extinctie (OD) moet elke versturende teststof op ten minste twee levensvatbare duploweefsels aangebracht, die de hele testprocedure doorlopen maar tijdens de MTT-incubatiestap geïncubeerd worden met medium in plaats van MTT-oplossing om zo tot een niet-specifieke kleurcontrole (NSC_{levend}-controle) te komen (34) (35). Vanwege de inherente biologische variabiliteit van levende weefsels moet de NSC_{levend}-controle gelijktijdig worden uitgevoerd met het testen van de gekleurde teststof. In geval van meerdere testen moet er voor elke test die wordt uitgevoerd (in elke testrun), een onafhankelijke NSC_{levend}-controle worden verricht. De werkelijke weefsellevensvatbaarheid wordt berekend als: de procentuele levensvatbaarheid verkregen met levende weefsels die zijn blootgesteld aan de versturende teststof en geïncubeerd met MTT-oplossing (%Levensvatbaarheid_{test}), minus het percentage niet-specifieke kleur verkregen met levende weefsels die zijn blootgesteld aan de versturende teststof en geïncubeerd in medium zonder MTT, gelijktijdig uitgevoerd met de te corrigeren test (%NSC_{levend}), d.w.z. werkelijke weefsellevensvatbaarheid = [%Levensvatbaarheid_{test}] - [%NSC_{levend}]
38. Om rechtstreeks MTT reducerende stoffen te herkennen moet elke teststof worden toegevoegd aan vers bereide MTT-oplossing. Er wordt een passende hoeveelheid teststof toegevoegd aan een MTT-oplossing en dit mengsel wordt ongeveer 3 uur geïncubeerd onder standaard kweekomstandigheden (zie de aanhangsels III en IV) (34) (35). Als het MTT-mengsel met de teststof (of de suspensie voor onoplosbare teststoffen) blauw/paars wordt, wordt de teststof als een rechtstreeks MTT reducerende stof beschouwd en moet een verdere functionele toetsing op niet-levensvatbare RhCE-weefselpreparaten worden uitgevoerd, ongeacht of de meting van de standaard extinctie (OD) of een HPLC/UPLC-spectrofotometrieprocedure wordt gebruikt. Bij deze aanvullende functionele toetsing worden gedode weefsels gebruikt die slechts een residuele metabole activiteit vertonen, maar de teststof wel absorberen en vasthouden op vergelijkbare wijze als levensvatbare weefsels. Gedode VRM1-weefsels worden bereid door blootstelling aan lage temperatuur („door bevriezing gedood”). Gedode VRM2-weefsels worden bereid door langdurige incubatie (bv. ten minste 24 ± 1 uur) in water, gevolgd door bewaring bij lage temperatuur („in water gedood”). Om een controle voor niet-specifieke MTT-reductie (NSMTT) te genereren wordt elke MTT reducerende teststof op ten minste twee gedode duploweefsels aangebracht, die de gehele testprocedure ondergaan (34) (35). Per teststof is één NSMTT-controle voldoende, ongeacht het aantal onafhankelijk uitgevoerde tests/testruns. De werkelijke weefsellevensvatbaarheid wordt berekend als: de procentuele levensvatbaarheid van het weefsel verkregen met levende weefsels die zijn blootgesteld aan de MTT reducerende stof (%Levensvatbaarheid_{test}), minus het percentage niet-specifieke MTT-reductie verkregen met de gedode weefsels die aan de zelfde MTT reducerende stof zijn blootgesteld, ten opzichte van de negatieve controle die gelijktijdig met de te corrigeren test is uitgevoerd (%NSMTT), d.w.z. werkelijke weefsellevensvatbaarheid = [%Levensvatbaarheid_{test}] - [%NSMTT].
39. Voor teststoffen waarvan wordt vastgesteld dat ze zowel kleurinterferentie (zie punt 37) als rechtstreekse reductie van MTT veroorzaken (zie punt 38), is naast de in de vorige punten beschreven NSMTT- en NSC_{levend}-controles nog een derde reeks controles nodig, wanneer de meting van de standaard extinctie (OD) wordt uitgevoerd. Dit geldt doorgaans voor donkergekleurde teststoffen die licht absorberen in het bereik van 570 ± 30 nm (bv. blauwe, paarse of zwarte stoffen), omdat hun intrinsieke kleur de beoordeling van hun vermogen om rechtstreeks MTT te reduceren zoals beschreven in punt 38 belemmert. Dit maakt een standaard gebruik van NSMTT-controles samen met NSC_{levend}-controles noodzakelijk. Teststoffen waarvoor zowel NSMTT-controles als NSC_{levend}-controles worden uitgevoerd, worden mogelijk zowel door levende als gedode weefsels geabsorbeerd en vastgehouden. Daarom corrigeert de NSMTT-controle in dit geval mogelijk niet alleen voor potentiële rechtstreekse MTT-reductie door de teststof, maar ook voor kleurinterferentie die voortkomt uit de absorptie en retentie van de teststof door de gedode weefsels. Dit zou kunnen leiden tot een dubbele correctie voor kleurinterferentie, aangezien de NSC_{levend}-controle al voor kleurinterferentie als gevolg van de absorptie en retentie van de teststof door levende weefsels corrigeert. Om een mogelijke dubbele correctie voor kleurinterferentie te vermijden moet een derde controle voor niet-specifieke kleur

in gedode weefsels (NSC_{gedood}) worden uitgevoerd (zie de aanhangsels III en IV) (34) (35). In deze extra controle wordt de teststof aangebracht op ten minste twee duplo's van gedood weefsel, die de gehele testprocedure doorlopen maar in de MTT-incubatiestap geïncubeerd worden met medium in plaats van met MTT-oplossing. Per teststof is één NSC_{gedood} -controle voldoende, ongeacht het aantal onafhankelijke tests/testruns dat wordt uitgevoerd, maar deze moet gelijktijdig worden uitgevoerd met de NSMTT-controle en met dezelfde weefselbatch. De werkelijke weefsellevensvatbaarheid wordt berekend als: de procentuele levensvatbaarheid verkregen met levende weefsels die zijn blootgesteld aan de teststof ($\%Levensvatbaarheid_{test}$) minus %NSMTT minus NSC_{levend} plus het percentage niet-specifieke kleur verkregen met gedode weefsels die zijn blootgesteld aan de verstoringende teststof en geïncubeerd met medium zonder MTT, ten opzichte van de negatieve controle die gelijktijdig met de te corrigeren test is uitgevoerd ($\%NSC_{gedood}$), d.w.z. werkelijke weefsellevensvatbaarheid = $[\%Levensvatbaarheid_{test}] - [\%NSMTT] - [\%NSC_{levend}] + [\%NSC_{gedood}]$.

40. Het is van belang op te merken dat niet-specifieke MTT-reductie en niet-specifieke kleurinterferenties de OD van het weefsel-extract kunnen verhogen tot buiten het lineariteitsbereik van de spectrofotometer (in het geval van standaard extinctiemetingen) en dat niet-specifieke MTT-reductie ook de piekoppervlakte voor MTT-formazan van het weefsel-extract kan vergroten tot buiten het lineariteitsbereik van de spectrofotometer (in het geval van HPLC/UPLC-spectrofotometriemetingen). Daarom is het van belang dat elk laboratorium, alvorens te beginnen met het testen van teststoffen met het oog op regelgeving, eerst het lineariteitsbereik van de spectrofotometer voor de OD/piekoppervlakte bepaalt met MTT-formazan (CAS RN 57360-69-7), in de handel verkrijgbaar van bv. Sigma-Adrich (cat. nr. M2003).
41. Standaard extinctiemeting (OD-meting) met een spectrofotometer is een geschikte methode voor de beoordeling van rechtstreeks MTT-reducerende stoffen en teststoffen die kleurinterferentie vertonen, als de waargenomen verstoring van de meting van MTT-formazan niet te sterk is (d.w.z. als de OD's van de weefsel-extracten die worden verkregen met de teststof zonder correctie voor rechtstreekse MTT-reductie en/of kleurinterferentie, binnen het lineariteitsbereik van de spectrofotometer vallen). Niettemin moeten de resultaten voor teststoffen die een %NSMTT en/of een NSC_{levend} van $\geq 60\%$ (VRM1 en VRM2, protocol voor vloeistoffen) of 50% (VRM2, protocol voor vaste stoffen) van de negatieve controle opleveren, met omzichtigheid worden benaderd, aangezien dit de vastgestelde drempelwaarden zijn die in de VRM's als scheiding tussen ingedeelde en niet-ingedeelde stoffen fungeren (zie punt 44). De standaard extinctie (OD) kan echter niet worden gemeten wanneer de verstoring van MTT-formazan te sterk is (d.w.z. de verstoring leidt ertoe dat de ongecorrigeerde OD's van de testweefsel-extracten buiten het lineariteitsbereik van de spectrofotometer vallen). Gekleurde teststoffen of teststoffen die gekleurd worden wanneer ze in contact komen met water of isopropanol, die de meting van de standaard extinctie (OD) van MTT-formazan te sterk verstoren, kunnen nog altijd worden beoordeeld met behulp van HPLC/UPLC-spectrofotometrie (zie aanhangsels III en IV). In het HPLC/UPLC-systeem kan het MTT-formazan namelijk van de chemische stof worden gescheiden, voordat het gekwantificeerd wordt (36). Daarom zijn er bij gebruik van HPLC/UPLC-spectrofotometrie geen NSC_{levend} - of NSC_{gedood} -controles nodig, ongeacht de geteste chemische stof. Als echter wordt vermoed dat de teststof rechtstreeks MTT-reduceert, moeten er wel NSMTT-controles worden toegepast (volgens de in punt 38 beschreven procedure). NSMTT-controles moeten ook worden toegepast als van teststoffen wordt vermoed dat ze (van zichzelf of in water) een kleur hebben die de beoordeling van het vermogen om rechtstreeks MTT te reduceren (zoals beschreven in punt 38) belemmert. Bij gebruik van HPLC/UPLC-spectrofotometrie voor het meten van MTT-formazan wordt de procentuele levensvatbaarheid van het weefsel berekend als percentage van de piekoppervlakte voor MTT-formazan verkregen met levende weefsels die aan de teststof zijn blootgesteld, ten opzichte van de piekoppervlakte voor MTT-formazan verkregen met de gelijktijdige negatieve controle. Voor teststoffen die rechtstreeks MTT kunnen reduceren, wordt de weefsellevensvatbaarheid berekend als: $\%Levensvatbaarheid_{test}$ minus %NSMTT, zoals beschreven in de laatste zin van punt 38. Tot slot zij erop gewezen dat rechtstreeks MTT-reducerende stoffen of rechtstreeks MTT-reducerende stoffen die ook kleurinterferentie vertonen, als ze na de behandeling in de weefsels achterblijven en MTT zo sterk reduceren dat dit OD's (met standaard OD-meting) of piekoppervlakten (met HPLC/UPLC-spectrofotometrie) oplevert voor de geteste weefsel-extracten die buiten het lineariteitsbereik van de spectrofotometer vallen, niet met RhCE-testmethoden beoordeeld kunnen worden, hoewel dergelijke gevallen naar verwachting slechts zeer zelden voorkomen.

42. HPLC/UPLC-spectrofotometrie kan voor alle typen teststoffen (al dan niet gekleurd, al dan niet MTT reducerend) worden gebruikt voor het meten van MTT-formazan (11) (36). Vanwege de diversiteit van HPLC/UPLC-spectrofotometriestystemen is het niet mogelijk om voor elke gebruiker een precies gelijke systeemopzet te realiseren. Daarom moet de deugdelijkheid van het HPLC/UPLC-spectrofotometriestelsel worden aangetoond alvorens het wordt gebruikt voor het kwantificeren van MTT-formazan in weefselextracten, door aan de aanvaardbaarheidscriteria te voldoen voor een reeks standaard deugdelijkheidsparameters op basis van de parameters beschreven in de voor de industrie bestemde leidraad van de Amerikaanse Food and Drug Administration voor de validering van bio-analytische methoden (36) (38). Deze kritische parameters en de bijbehorende aanvaardbaarheidscriteria worden weergegeven in aanhangsel 5. Als aan de in aanhangsel 5 gestelde aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt het HPLC/UPLC-spectrofotometriestelsel als deugdelijk beschouwd en kan het worden gebruikt voor het meten van MTT-formazan onder de experimentele omstandigheden die worden beschreven in deze testmethode.

Aanvaardbaarheidscriteria

43. Voor elke testrun met RhCE-batches die de kwaliteitscontrole hebben doorstaan (zie punt 30), moeten de weefsels die met de negatievecontrolestof zijn behandeld, een OD vertonen die overeenkomt met de kwaliteit van de weefsels na vervoer, ontvangst en alle stappen van het protocol, en die niet buiten de in tabel 2 beschreven historisch bepaalde grenzen mag liggen (zie punt 26). Evenzo moet voor weefsels die met de positievecontrolestof, d.w.z. met methylacetaat, zijn behandeld, de gemiddelde weefsellevensvatbaarheid < 50 % zijn ten opzichte van de negatieve controle in VRM1 met het protocol voor vloeistoffen of dat voor vaste stoffen, en ≤ 30 % (protocol voor vloeistoffen) of ≤ 20 % (protocol voor vaste stoffen) ten opzichte van de negatieve controle in VRM2, overeenkomend met het vermogen van de weefsels om op een irriterende teststof te reageren onder de omstandigheden van de testmethode (34) (35). De variabiliteit tussen duploweefsels voor teststoffen en controlestoffen moet binnen de aanvaardbare grenzen liggen (d.w.z. het verschil in levensvatbaarheid tussen twee duploweefsels moet kleiner zijn dan 20 % of de standaarddeviatie (SD) tussen drie duploweefsels mag niet groter zijn dan 18 %). Als de negatieve controle of de positieve controle in een testrun buiten het aanvaardbare bereik valt, wordt de testrun als „ondeugdelijk” beschouwd en moet deze worden overgedaan. Als de variabiliteit tussen de duploweefsels voor een teststof buiten het aanvaardbare bereik ligt, moet de test als „ondeugdelijk” worden beschouwd en moet de teststof hertest worden.

Interpretatie van de resultaten en voorspellingsmodel

44. De OD-waarden/piekoppervlakten die zijn verkregen met de duploweefselextracten voor elke teststof, moeten worden gebruikt voor het berekenen van de gemiddelde procentuele weefsellevensvatbaarheid (gemiddelde over duploweefsels) genormaliseerd ten opzichte van de negatieve controle, die op 100 % wordt gesteld. De drempelwaarde van de procentuele weefsellevensvatbaarheid voor het identificeren van teststoffen waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is (VN-GHS/CLP Geen categorie), wordt gegeven in tabel 4. De resultaten moeten derhalve als volgt worden geïnterpreteerd:

- De teststof wordt geïdentificeerd als chemische stof waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is volgens VN-GHS/CLP Geen categorie, als de gemiddelde procentuele weefsellevensvatbaarheid na blootstelling en na-incubatie hoger is dan (gt;) de vastgestelde drempelwaarde van de procentuele weefsellevensvatbaarheid zoals weergegeven in tabel 4. In dat geval is het niet nodig om met andere testmethoden verder te testen.
- Als de gemiddelde procentuele weefsellevensvatbaarheid na blootstelling en na-incubatie lager is dan of gelijk aan (\leq) de vastgestelde drempelwaarde van de procentuele weefsellevensvatbaarheid zoals weergegeven in tabel 4, kan er geen voorspelling worden gedaan. In dat geval zijn er verdere tests met andere testmethoden nodig, omdat de RhCE-testmethoden een zeker aantal vals-positieve resultaten laten zien (zie de punten 14-15) en geen onderscheid kunnen maken tussen de VN-GHS/CLP-categorieën 1 en 2 (zie punt 17).

Tabel 4

Voorspellingsmodellen volgens de VN-GHS en CLP-classificatie

VRM	Geen categorie	Er kan geen voorspelling worden gedaan
VRM1 - EpiOcular™ EIT (voor beide protocollen)	Gemiddelde weefsellevensvatbaarheid > 60 %	Gemiddelde weefsellevensvatbaarheid ≤ 60 %
VRM2 - SkinEthic™ HCE EIT (voor het protocol voor vloeistoffen)	Gemiddelde weefsellevensvatbaarheid > 60 %	Gemiddelde weefsellevensvatbaarheid ≤ 60 %
VRM2 - SkinEthic™ HCE EIT (voor het protocol voor vaste stoffen)	Gemiddelde weefsellevensvatbaarheid > 50 %	Gemiddelde weefsellevensvatbaarheid ≤ 50 %

45. Eén test bestaande uit ten minste twee duploweefsels zou voldoende moeten zijn voor een teststof, indien het resultaat ondubbelzinnig is. Echter, bij grensgevallen zoals niet-concordante metingen van duplo's en/of een gemiddelde procentuele weefsellevensvatbaarheid van $60 \pm 5\%$ (VRM1 en VRM2, protocol voor vloeistoffen) of $50 \pm 5\%$ (VRM2, protocol voor vaste stoffen), moet een tweede test worden overwogen, evenals een derde testrun in geval van niet-concordante resultaten tussen de eerste twee tests.
46. Indien van toepassing en gerechtvaardigd kan ter verbetering van de algemene prestaties van de testmethode voor bepaalde typen mengsels worden overwogen om verschillende drempelwaarden van de procentuele weefsellevensvatbaarheid te gebruiken als scheiding tussen geclassificeerde en niet-geclassificeerde teststoffen (zie punt 14). Voor het beoordelen van het potentieel voor ernstig oogletsel/oogirritatie van onbekende teststoffen of productklassen, of van het relatieve toxisch potentieel voor de ogen van een geclassificeerde chemische stof binnen een bepaald spectrum van positieve responsen kan het nuttig zijn om ijkstoffen te gebruiken.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

47. Voor elke teststof moeten de gegevens van de afzonderlijke duploweefsels in een testrun (bv. OD-waarden/MTT-formazan-piekoppervlakten en berekende gegevens voor de procentuele weefsellevensvatbaarheid voor de teststoffen en controles, en de uiteindelijke voorspelling van de EhCR-testmethode) in tabelvorm in het verslag worden opgenomen, met inbegrip van gegevens uit herhaalde tests, indien van toepassing. Bovendien moeten voor elke afzonderlijke teststof en controle de gemiddelde procentuele weefsellevensvatbaarheid en het verschil in levensvatbaarheid tussen twee duploweefsels (indien $n=2$ duploweefsels of de SD (indien $n \geq 3$ duploweefsels) in het verslag worden opgenomen. Ook eventuele storingen van de MTT-formazanmeting door een teststof door rechtstreekse reductie van MTT en/of kleurinterferentie moeten voor elke geteste chemische stof in het verslag worden opgenomen.

Testverslag

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

Teststof

Stof die uit één component bestaat

- chemische identificatie, zoals IUPAC- of CAS-na(a)m(en), CAS-registratienummer(s), SMILES- of InChI-code(s), structuurformules en/of andere identificatiemiddelen;
- fysische toestand, vluchtigheid, pH, LogP, molecuulgewicht, chemische klassen en aanvullende fysisch-chemische eigenschappen die relevant zijn voor het uitvoeren van het onderzoek, voor zover beschikbaar;

- zuiverheid, chemische naam van onzuiverheden waar passend en praktisch haalbaar enz.;
- behandeling voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);
- bewaaromstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar.

Stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB en mengsel

- karakterisering, voor zover mogelijk aan de hand van bv. chemische identiteit (zie hierboven), zuiverheid, kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen (zie hierboven) van de bestanddelen, voor zover beschikbaar;
- fysische toestand en aanvullende fysisch-chemische eigenschappen die relevant zijn voor het uitvoeren van het onderzoek, voor zover beschikbaar;
- zuiverheid, chemische naam van onzuiverheden waar passend en praktisch haalbaar enz.;
- behandeling voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);
- bewaaromstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar.

Positieve- en negatievecontrolestoffen

- chemische identificatie, zoals IUPAC- of CAS-na(a)m(en), CAS-registratienummer(s), SMILES- of InChI-code(s), structuurformules en/of andere identificatiemiddelen;
- fysische toestand, vluchtigheid, molecuulgewicht, chemische klassen en aanvullende fysisch-chemische eigenschappen die relevant zijn voor het uitvoeren van het onderzoek, voor zover beschikbaar;
- zuiverheid, chemische naam van onzuiverheden waar passend en praktisch haalbaar enz.;
- behandeling voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);
- bewaaromstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar;
- rechtvaardiging voor het gebruik van een andere negatieve controle dan ultrazuiver H₂O of Ca²⁺/Mg²⁺-vrije DPBS, indien van toepassing;
- rechtvaardiging voor het gebruik van een andere positieve controle dan zuiver methylacetaat, indien van toepassing;
- verwijzing naar historische positieve- en negatievecontroleresultaten waaruit de geschiktheid van de aanvaardbaarheidscriteria voor de testrun blijkt.

Informatie met betrekking tot de opdrachtgever en de testinstallatie

- naam en adres van de opdrachtgever, testinstallatie en de onderzoeksleider.
- RhCE-weefselpreparaat en gebruikt protocol (met motivering voor keuzes, indien van toepassing)

Omstandigheden van de testmethode

- het gebruikte RhCE-weefselpreparaat, met inbegrip van het batchnummer;
- golflengte en bandbreedte (indien van toepassing) die voor het kwantificeren van MTT-formazan zijn gebruikt, en lineariteitsbereik van de meetapparatuur (bv. spectrofotometer);
- een beschrijving van de methode die voor het kwantificeren van MTT-formazan is gebruikt;
- een beschrijving van het gebruikte HPLC/UPLC-spectrofotometriesysteem, indien van toepassing;
- volledige ondersteunende informatie over het specifieke gebruikte RhCE-weefselpreparaat, met inbegrip van de deugdelijkheid daarvan. Hieronder moet ten minste informatie zijn over:
 - i) levensvatbaarheid bij kwaliteitscontrole (QC) (leverancier);
 - ii) levensvatbaarheid onder de omstandigheden van de testmethode (gebruiker);
 - iii) barrièrefunctie bij QC;
 - iv) morfologie, voor zover gegevens beschikbaar zijn;
 - v) reproduceerbaarheid en voorspellend vermogen;
 - vi) andere QC-gegevens over het RhCE-weefselpreparaat, indien beschikbaar;
- verwijzingen naar historische gegevens over het RhCE-weefselpreparaat. Hieronder moet ten minste informatie zijn over: de aanvaardbaarheid van de QC-gegevens met verwijzing naar historische batchgegevens;
- verklaring dat voorafgaand aan het routinematig gebruik van de testmethode de bekwaamheid van de testfaciliteit in de toepassing ervan is aangetoond door middel van het testen van de chemische stoffen voor bekwaamheidstoetsing.

Aanvaardbaarheidscriteria voor de test en testruns

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

Testprocedure

- gedetailleerde informatie over de gebruikte testprocedure;
- de gebruikte doses van de teststof en de controlestoffen;
- duur en temperatuur van de blootstellings-, onderdompelings- (na de blootstelling) en na-incubatieperioden (voor zover van toepassing);
- een beschrijving van eventuele wijzigingen van de testprocedure;

- indicatie van de controles die zijn gebruikt voor rechtstreeks MTT-reducerende stoffen en/of gekleurde teststoffen, indien van toepassing;
- het aantal gebruikte duploweefsels per teststof en controles (positieve controle, negatieve controle en NSMTT, NSC_{levend} en NSC_{gedood} , indien van toepassing).

Resultaten

- een tabel met gegevens voor afzonderlijke teststoffen en controlestoffen, voor elke testrun (met inbegrip van herhalingen, voor zover van toepassing) en elke duplometing met inbegrip van OD-waarde of MTT-formazan-piekoppervlakte, procentuele levensvatbaarheid van de weefsels, gemiddelde procentuele levensvatbaarheid van de weefsels, verschil tussen duploweefsels of SD en de uiteindelijke voorspelling;
- indien van toepassing: resultaten van de gebruikte controles voor rechtstreeks MTT reducerende stoffen en/of gekleurde teststoffen, met inbegrip van OD-waarde of MTT-formazan-piekoppervlakte, %NSMTT, $\%NSC_{levend}$, $\%NSC_{gedood}$, verschil tussen duploweefsels of SD, de uiteindelijke gecorrigeerde procentuele weefsellevensvatbaarheid, en de uiteindelijke voorspelling;
- resultaten verkregen met de teststof(fen) en controlestoffen ten opzichte van de vastgestelde aanvaardbaarheids-criteria voor de test en testruns;
- een beschrijving van andere waargenomen effecten, bv. verkleuring van de weefsels door een gekleurde teststof.

Bespreking van de resultaten

Conclusie

LITERATUUR

- (1) VN (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York en Genève: Verenigde Naties. Beschikbaar op: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (2) Hoofdstuk B.5 van deze bijlage, Acute oogirritatie/-corrosie.
- (3) Hoofdstuk B.47 van deze bijlage, Bovine Corneal Opacity and Permeability- (BCOP)-testmethode voor de identificatie van i) chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken en ii) chemische stoffen waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is.
- (4) Hoofdstuk B.48 van deze bijlage, Isolated Chicken Eye-testmethode voor de identificatie van i) chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken en ii) chemische stoffen waarvoor classificatie niet nodig is.
- (5) Hoofdstuk B.61 van deze bijlage, Fluoresceïnelekkage-testmethode voor de identificatie van voor het oog corrosieve en hevig irriterende stoffen.
- (6) Hoofdstuk B.68 van deze bijlage, in-vitrotestmethode met korte blootstelling voor de identificatie van i) chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken en ii) chemische stoffen waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is.
- (7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010,261-266.

- (8) EC EURL CEVMA (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Beschikbaar op: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280>.
- (9) Raadgevend wetenschappelijk comité van het EURL CEVMA (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Beschikbaar op: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702>.
- (10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D., Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.
- (11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.
- (12) Raadgevend wetenschappelijk comité van het EURL CEVMA (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390. Beschikbaar op: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704>.
- (13) EC EURL CEVMA (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Manuscript in voorbereiding).
- (14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. *Journal of Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.
- (15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.
- (16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (17) OESO (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.
- (18) OESO (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

- (19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.
- (20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), *Alternative Toxicological Methods*, CRC Press, pp. 147-159.
- (21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619-626.
- (22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476-1488.
- (23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.
- (24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.
- (25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.
- (26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.
- (27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatotoxicology* Marzulli F.N. and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749-815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.
- (28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons* Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665-697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.
- (29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922-936.

- (30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.
- (31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115-130.
- (32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610-2625.
- (33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan.Ocul. Toxicol.* 25, 41-54.
- (34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Beschikbaar op: [<https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>].
- (35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Versie 1. (20 juli 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Beschikbaar op: <https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>.
- (36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.
- (37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.
- (38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Mei 2001. Beschikbaar op: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.
- (39) OESO (2017). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Serious Eye Damage and Eye Irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Afw.: afwijking.

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een testmethode, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden uitgevoerd. De betrouwbaarheid wordt beoordeeld door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid en intralaboratoriumherhaalbaarheid (18).

Bewijskracht(proces): het proces waarbij de sterke en zwakke punten van verschillende gegevens worden onderzocht bij het komen tot en ondersteunen van een conclusie met betrekking tot het gevarenpotentieel van een teststof.

Bottom-upbenadering: een trapsgewijze benadering die gebruikt wordt voor een teststof waarvan wordt vermoed dat classificatie en etikettering voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is, die begint met het onderscheiden van chemische stoffen waarvoor classificatie en etikettering niet nodig is (negatief resultaat) van andere chemische stoffen (positief resultaat).

Chemische stof: een stof of een mengsel.

Concordantie: zie „Nauwkeurigheid”.

CV: variatiecoëfficiënt.

EIT: oogirritatietest (Eye Irritation Test).

Ernstig oogletsel: het ontstaan van veranderingen in het oog na het aanbrengen van een teststof op het oppervlak aan de voorzijde van het oog, die binnen 21 dagen na het aanbrengen volledig omkeerbaar zijn. Verwisselbaar met „Onomkeerbare effecten op ogen” en met „VN-GHS/CLP-categorie 1”.

ET₅₀: de blootstellingstijd die nodig is om de weefsellevensvatbaarheid met 50 % te doen dalen bij aanbrenging van een ijkstof in een bepaalde, vaste concentratie.

EURL-CEVMA: referentielaboratorium van de Europese Unie voor alternatieve methoden ter vervanging van dierproeven.

Gevaar: inherente eigenschap van een agens of situatie die nadelige effecten kan veroorzaken als een organisme, systeem of (sub)populatie aan dit agens wordt blootgesteld.

Geldige testmethode: een testmethode die voldoende relevant en betrouwbaar wordt geacht voor een specifiek doel en gebaseerd is op wetenschappelijk verantwoorde beginselen. Een testmethode is nooit algemeen geldig, maar enkel met betrekking tot een specifiek doel (18).

Gevalideerde testmethode: een testmethode waarvoor valideringsstudies zijn gedaan om de relevantie (inclusief nauwkeurigheid) en betrouwbaarheid voor een bepaald doel te bepalen. Er moet worden opgemerkt dat een gevalideerde testmethode niet per definitie voldoende nauwkeurig en betrouwbaar is om aanvaardbaar te worden bevonden voor het voorgestelde doel (18).

Gevoeligheid: het percentage van alle positieve/actieve teststoffen dat door de test correct wordt ingedeeld. Dit is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert en is een belangrijke factor voor de beoordeling van de relevantie van een testmethode (18).

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

HCE: SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (menselijk hoornvliesepitheel).

Hoornvlies: het doorschijnende gedeelte van het voorste deel van de oogbal dat de iris en pupil bedekt en licht naar binnen toelaat.

HPLC: hogeprestatievloei- of chromatografie.

IC₅₀: de concentratie te bepalen waarin een ijkstof de weefsellevensvatbaarheid het weefsel met 50 % doet dalen na een vaste blootstellingstijd (bv. 30 minuten behandeling met SDS).

Ijkstof: een stof die wordt gebruikt als norm voor vergelijking met een teststof. Een ijkstof moet de volgende eigenschappen hebben: i) (een) constante en betrouwbare bron(nen) voor de identificatie en karakterisering ervan; ii) in structureel, functioneel en/of chemisch opzicht of qua productklasse soortgelijk aan de geteste chemische stof(fen); iii) bekende fysisch-chemische eigenschappen; iv) ondersteunende gegevens met betrekking tot bekende effecten, en v) bekende potentie binnen het bereik van de gewenste respons.

LLOQ: onderste bepaalbaarheidsgrens (Lower Limit of Quantification).

LogP: logaritme van de octanol-water-verdelingscoëfficiënt.

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

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

Nauwkeurigheid: de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de testmethode en erkende referentiewaarden. Het is een maat voor de prestaties van de testmethode en één aspect van „relevantie”. Deze term en de term „concordantie”, waaronder het percentage correcte uitkomsten van een testmethode wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt (18).

Negatieve controle: een monster met alle bestanddelen van een testsysteem dat met een stof behandeld werd waarvan bekend is dat deze in het testsysteem geen positieve respons opwekt. Dit monster wordt samen met de met de teststof behandelde monsters en andere controlemonsters verwerkt en wordt gebruikt voor het vaststellen van 100 % weefsellevensvatbaarheid.

Niet ingedeeld: stoffen die niet zijn geclassificeerd voor oogirritatie (VN-GHS/CLP-categorie 2, VN-GHS-categorie 2A of 2B) of ernstig oogletsel (VN-GHS/CLP-categorie 1). Verwisselbaar met „VN-GHS/CLP Geen categorie”.

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

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

NSMTT: niet-specifieke MTT-reductie.

OD: optische dichtheid.

Omkeerbare effecten op ogen: zie „Oogirritatie”.

Oneindige dosis: hoeveelheid op het RhCE-weefselpreparaat aangebrachte teststof die groter is dan de hoeveelheid die nodig is om het epitheeloppervlak volledig en gelijkmatig te bedekken.

Onomkeerbare effecten op ogen: zie „Ernstig oogletsel”.

Oogirritatie: veranderingen in het oog na het aanbrengen van een teststof op het oppervlak aan de voorzijde van het oog, die binnen 21 dagen na het aanbrengen volledig omkeerbaar zijn. Verwisselbaar met „Omkeerbare effecten op ogen” en met „VN-GHS/CLP-categorie 2”.

Percentage vals-negatieve uitslagen: het percentage van alle positieve stoffen dat door de testmethode onterecht als negatief wordt geïdentificeerd. Het is één indicator van de prestaties van de testmethode.

Percentage vals-positieve uitslagen: het percentage van alle negatieve stoffen dat door een testmethode onterecht als positief wordt geïdentificeerd. Het is één indicator van de prestaties van de testmethode.

Positieve controle: een monster met alle bestanddelen van een testsysteem dat met een stof behandeld werd waarvan bekend is dat deze in het testsysteem een positieve respons opwekt. Dit monster wordt samen met de met de teststof behandelde monsters en andere controlemonsters verwerkt. Om te verzekeren dat variabiliteit in de positieve controlerespons doorheen de tijd kan worden beoordeeld, mag de grootte van de positieve respons niet buitensporig zijn.

Prestatienormen: normen, gebaseerd op een gevalideerde, wetenschappelijk geldig bevonden testmethode, die de basis vormen voor de beoordeling van de vergelijkbaarheid van een voorgestelde, in mechanistisch en functioneel opzicht gelijksoortige testmethode. Hieronder begrepen zijn: i) essentiële componenten van de testmethode; ii) een minimumlijst van referentiestoffen die zijn gekozen uit de stoffen die zijn gebruikt om de aanvaardbare prestaties van de gevalideerde testmethode aan te tonen, en iii) de vergelijkbare nauwkeurigheids- en betrouwbaarheidsniveaus die door de voorgestelde testmethode moeten worden gehaald wanneer ze worden beoordeeld aan de hand van de minimumlijst van referentiestoffen; deze waarden zijn gebaseerd op de waarden die voor de gevalideerde testmethode zijn verkregen (18).

Relevantie: beschrijving van het verband van de test met het te onderzoeken effect en of de test betekenis heeft en nuttig is voor een bepaald doel. Het is de mate waarin de test het te onderzoeken biologische effect correct meet of voorspelt. Relevantie omvat een beoordeling van de nauwkeurigheid (concordantie) van een testmethode (18).

Reproduceerbaarheid: de overeenkomst tussen resultaten verkregen uit herhaalde tests op dezelfde chemische stof met behulp van hetzelfde testprotocol (zie „Betrouwbaarheid”) (18).

RhCE: gereconstrueerd model van menselijk hoornvliesepitheel (Reconstructed human Cornea-like Epithelium).

SD: standaarddeviatie.

Specificiteit: het percentage van alle negatieve/inactieve teststoffen dat door de test correct wordt ingedeeld. Dit is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert en is een belangrijke factor voor de beoordeling van de relevantie van een testmethode (18).

Standard Operating Procedures (SOP): formele schriftelijke procedures waarin uitvoerig wordt beschreven hoe specifieke routinematige en testspecifieke laboratoriumhandelingen moeten worden uitgevoerd. Ze zijn verplicht voor GLP.

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

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

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

Test: één teststof die gelijktijdig wordt getest op ten minste twee duploweefsels zoals gedefinieerd in de overeenkomstige SOP.

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

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

Top-downbenadering: een trapsgewijze benadering die wordt gebruikt voor een chemische stof waarvan wordt vermoed dat deze ernstig oogletsel veroorzaakt, die begint met het onderscheiden van chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken (positief resultaat) van andere chemische stoffen (negatief resultaat).

Trapsgewijze teststrategie: een teststrategie waarbij opeenvolgende testmethoden worden gebruikt. Alle bestaande informatie over een teststof op elke trap wordt herbezien aan de hand van een proces op basis van bewijskracht om te bepalen of er voldoende informatie beschikbaar is voor een beslissing tot gevarenclassificatie, vooraleer wordt overgegaan tot de volgende trap in de strategie. Als op een bepaalde trap op basis van de bestaande informatie het mogelijke gevaar/de potentie van een teststof kan worden bepaald, zijn er geen verdere tests nodig (18).

ULOQ: bovenste bepaalbaarheidsgrens (Upper Limit of Quantification).

UPLC: ultrahogeprestatievloei-stofchromatografie.

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

Vervangende test: een test, ontworpen ter vervanging van een voor de identificatie van gevaren en/of risicobeoordeling geaccepteerde en routinematig gebruikte test, waarvan is vastgesteld dat hij, in vergelijking met de geaccepteerde test, de gezondheid van mens of dier of het milieu, naargelang het geval, gelijke of betere bescherming biedt voor alle mogelijke testsituaties en chemische stoffen (18).

VN-GHS/CLP-categorie 1: zie „Ernstig oogletsel”.

VN-GHS/CLP-categorie 2: zie „Oogirritatie”.

VN-GHS/CLP Geen categorie: chemische stoffen die niet voldoen aan de criteria voor classificatie in VN-GHS-categorie 1 of 2 (2A of 2B). Verwisselbaar met „Niet ingedeeld”.

VRM: gevalideerde referentiemethode.

VRM1: de EpiOcular™ EIT wordt aangeduid als gevalideerde referentiemethode 1.

VRM2: de SkinEthic™ HCE EIT wordt aangeduid als gevalideerde referentiemethode 2.

Weefsellevensvatbaarheid: een parameter waarmee de totale activiteit van een celpopulatie in een gereconstrueerd weefsel wordt gemeten als het vermogen om de vitale kleurstof MTT te reduceren, die, afhankelijk van het gemeten eindpunt en de opzet van de test, is gecorreleerd met het totale aantal en/of de vitaliteit van de levende cellen.

Aanhangsel 2

HOOFDCOMPONENTEN VAN DE RHCE-TESTS DIE ZIJN GEVALIDEERD VOOR DE IDENTIFICATIE VAN CHEMISCHE STOFFEN WAARVOOR CLASSIFICATIE EN ETIKETTERING VOOR OOGIRRITATIE OF ERNSTIG OOGLETSEL NIET NODIG IS

Testcomponenten	EpiOcular™ EIT (VRM1)	SkinEthic™ HCE EIT (VRM2)
Protocollen	Vloeistoffen (gedurende 15 minuten pipetteerbaar bij temperaturen van 37 ± 1 °C of lager)	Vloeistoffen en viskeuze stoffen (pipetteerbaar)
Oppervlak van het model	0,6 cm ²	0,5 cm ²
Aantal duploweefsels	Ten minste 2	Ten minste 2
Voorafgaande toetsing op kleurinterferentie	50 µl + 1 ml H ₂ O gedurende 60 min bij 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH (niet-gekleurde teststoffen), of 50 µl + 2 ml isopropanol gemengd gedurende 2-3 uur bij RT (gekleurde teststoffen) → als de OD van de teststof bij 570 ± 20 nm na aftrek van de OD voor isopropanol of water > 0,08 is (wat overeenkomt met ongeveer 5 % van de gemiddelde OD van de negatieve controle), moeten er aangepaste controles met levende weefsels worden uitgevoerd.	10 µl + 90 µl H ₂ O gemengd gedurende 30 ± 2 min bij RT (18-28 °C) → als de teststof gekleurd is, moeten er aangepaste controles met levende weefsels worden uitgevoerd
	Vaste stoffen (niet pipetteerbaar)	Vaste stoffen (niet pipetteerbaar)
	0,6 cm ²	0,5 cm ²
	Ten minste 2	Ten minste 2
	50 mg + 1 ml H ₂ O gedurende 60 min bij 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH (niet-gekleurde teststoffen) en/of 50 mg + 2 ml isopropanol gemengd gedurende 2-3 uur bij RT (gekleurde en niet-gekleurde teststoffen) → als de OD van de teststof bij 570 ± 20 nm na aftrek van de OD voor isopropanol of water > 0,08 is (wat overeenkomt met ongeveer 5 % van de gemiddelde OD van de negatieve controle), moeten er aangepaste controles met levende weefsels worden uitgevoerd.	10 mg + 90 µl H ₂ O gemengd gedurende 30 ± 2 min bij RT → als de teststof gekleurd is, moeten er aangepaste controles met levende weefsels worden uitgevoerd

Testcomponenten	EpiOcular™ EIT (VRM1)	SkinEthic™ EIT (VRM2)	SkinEthic™ HCE EIT (VRM2)
Voorafgaande toetsing op rechtstreekse MTT-reductie	<p>50 µl + 1 ml van een 1 mg/ml MTT-oplossing gedurende 180 ± 15 min bij 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95 % RH</p> <p>→ als de oplossing blauw/paars wordt, moeten er aangepaste controles met door bevestiging gedode weefsels worden uitgevoerd (als negatieve controle wordt 50 µl steriel gedetoniseerd water in MTT-oplossing gebruikt)</p>	<p>50 mg + 1 ml van een 1 mg/ml MTT-oplossing gedurende 180 ± 15 min bij 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95 % RH</p> <p>→ als de oplossing blauw/paars wordt, moeten er aangepaste controles met door bevestiging gedode weefsels worden uitgevoerd (als negatieve controle wordt 50 µl steriel gedetoniseerd water in MTT-oplossing gebruikt)</p>	<p>30 µl + 300 µl van een 1 mg/ml MTT-oplossing gedurende 180 ± 15 min bij 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95 % RH</p> <p>→ als de oplossing blauw/paars wordt, moeten er aangepaste controles met in water gedode weefsels worden uitgevoerd (als negatieve controle wordt 30 µl steriel gedetoniseerd water in MTT-oplossing gebruikt)</p>
Voorbehandeling	<p>20 µl Ca²⁺/Mg²⁺-vrije DPBS gedurende 30 ± 2 min bij 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95 % RH, beschermd tegen het licht.</p>	<p>20 µl Ca²⁺/Mg²⁺-vrije DPBS gedurende 30 ± 2 min bij 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95 % RH, beschermd tegen het licht.</p>	—
Doses van de behandeling en wijze van aanbrengen	<p>50 µl (83,3 µl/cm²)</p>	<p>50 mg (83,3 mg/cm²) met behulp van een gekalibreerd instrument (bv. een afgestreden maatlepel die is gekalibreerd op een inhoud van 50 mg natriumchloride).</p>	<p>30 µl Ca²⁺/Mg²⁺-vrije DPBS + 30 ± 2 mg (60 mg/cm²)</p> <p>Gebruik voor viskeuze stoffen nylongaas</p>
Blootstellingstijd en -temperatuur	<p>30 min (± 2 min) in kweekmedium bij 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95 % RH</p>	<p>6 uur (± 0,25 uur) in kweekmedium bij 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95 % RH</p>	<p>4 uur (± 0,1 uur) in kweekmedium bij 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95 % RH</p>

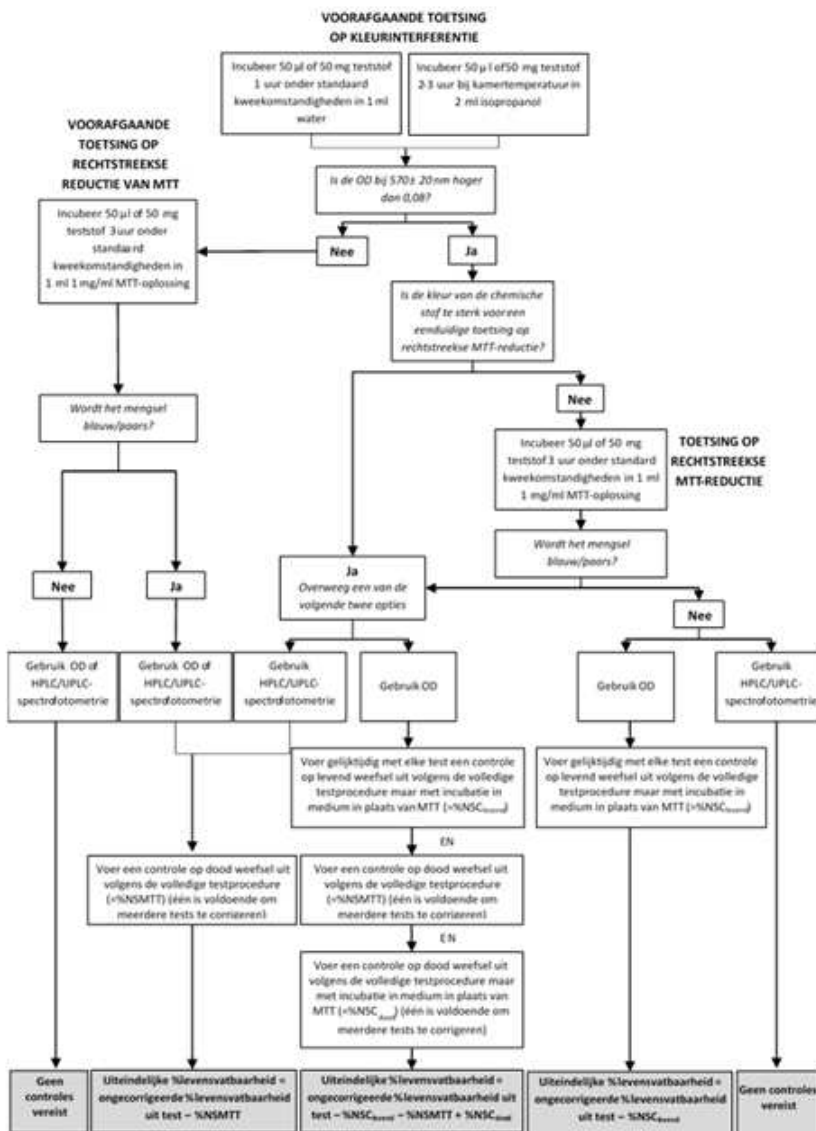
Testcomponenten	EpiOcular™ EIT (VRM1)	SkinEthic™ HCE EIT (VRM2)
Spoelen bij kamertemperatuur	3 maal in 100 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -vrije DPBS	25 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -vrije DPBS
Onderdempeling na blootstelling	12 min (± 2 min) bij RT in kweekmedium	30 min (± 2 min) bij RT in kweekmedium
Na-incubatie	120 min (15 min) in kweekmedium bij 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH	30 min (± 2 min) bij 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH in kweekmedium
Negatieve controle	50 µl H ₂ O Gelijkijdig getest	30 ± 2 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -vrije DPBS Gelijkijdig getest
Positieve controle	50 µl methylacetaat Gelijkijdig getest	30 ± 2 µl methylacetaat Gelijkijdig getest
	18 uur (± 0,25 uur) in kweekmedium bij 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH	18 uur (± 0,5 uur) in kweekmedium bij 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH
	50 µl H ₂ O Gelijkijdig getest	30 ± 2 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -vrije DPBS Gelijkijdig getest

Testcomponenten	EpiOcular™ EIT (VRM1)	300 µl 1 mg/ml	EpiOcular™ EIT (VRM1)	300 µl 1 mg/ml	SkinEthic™ HCE EIT (VRM2)	300 µl 1 mg/ml
MTT-oplossing	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT-incubatieduur -temperature	180 min (± 15 min) bij 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min) bij 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min) bij 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min) bij 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min) bij 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min) bij 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % RH
Extractievlloeistof	2 ml isopropanol (extractie van boven- en onderkant van inzetstuk door het weefsel door te prikken)	2 ml isopropanol (extractie van boven- en onderkant van inzetstuk door het weefsel door te prikken)	2 ml isopropanol (extractie van onderkant van inzetstuk door het weefsel door te prikken)	2 ml isopropanol (extractie van onderkant van inzetstuk door het weefsel door te prikken)	1,5 ml isopropanol (extractie van boven- en onderkant van inzetstuk)	1,5 ml isopropanol (extractie van onderkant van inzetstuk)
Extractieduur en -temperatuur	2-3 uur onder schudden (~ 120 rpm) bij RT of gedurende een nacht bij 4-10 °C	2-3 uur onder schudden (~ 120 rpm) bij RT of gedurende een nacht bij 4-10 °C	2-3 uur onder schudden (~ 120 rpm) bij RT of gedurende een nacht bij 4-10 °C	2-3 uur onder schudden (~ 120 rpm) bij RT of gedurende een nacht bij 4-10 °C	4 uur onder schudden (~ 120 rpm) bij RT of ten minste gedurende een nacht zonder schudden bij 4-10 °C	Ten minste 2 uur onder schudden (~ 120 rpm) bij RT
OD-meting	570 nm (550 - 590 nm) zonder referentiefilter	570 nm (550 - 590 nm) zonder referentiefilter	570 nm (550 - 590 nm) zonder referentiefilter	570 nm (550 - 590 nm) zonder referentiefilter	570 nm (540 - 600 nm) zonder referentiefilter	570 nm (540 - 600 nm) zonder referentiefilter
Weefselkwaliteitscontrole	Behandeling met 100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100 12,2 min ≤ ET ₅₀ ≤ 37,5 min	Behandeling met 100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100 12,2 min ≤ ET ₅₀ ≤ 37,5 min	Behandeling met 100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100 12,2 min ≤ ET ₅₀ ≤ 37,5 min	Behandeling met 100 µl 0,3 % (v/v) Triton X-100 12,2 min ≤ ET ₅₀ ≤ 37,5 min	30 min behandeling met SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,2 mg/ml	30 min behandeling met SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,2 mg/ml

Testcomponenten	EpiOcular™ EIT (VRM1)	EpiOcular™ EIT (VRM1)	SkinEthic™ HCE EIT (VRM2)
Aanvaardbaarheidscriteria	<p>1. De gemiddelde OD van de duploweefsels behandeld met de negatieve controle moet > 0,8 en < 2,5 zijn</p> <p>2. De gemiddelde levensvatbaarheid van de duploweefsels die gedurende 30 min zijn blootgesteld aan de positieve controle, uitgedrukt als % van de negatieve controle, moet < 50 % zijn</p> <p>3. Het verschil in levensvatbaarheid tussen twee duploweefsels moet kleiner zijn dan 20 %.</p>	<p>1. De gemiddelde OD van de duploweefsels behandeld met de negatieve controle moet > 0,8 en < 2,5 zijn</p> <p>2. De gemiddelde levensvatbaarheid van de duploweefsels die gedurende 6 uur zijn blootgesteld aan de positieve controle, uitgedrukt als % van de negatieve controle, moet < 50 % zijn</p> <p>3. Het verschil in levensvatbaarheid tussen twee duploweefsels moet kleiner zijn dan 20 %.</p>	<p>1. De gemiddelde OD van de duploweefsels behandeld met de negatieve controle moet > 1,0 en ≤ 2,5 zijn</p> <p>2. De gemiddelde levensvatbaarheid van de duploweefsels die gedurende 4 uur zijn blootgesteld aan de positieve controle, uitgedrukt als % van de negatieve controle, moet ≤ 20 % zijn</p> <p>3. Het verschil in levensvatbaarheid tussen twee duploweefsels moet kleiner zijn dan 20 %.</p>

Aanhangsel 3

ILLUSTRATIEF STROOMSCHEMA DAT ALS LEIDRAAD KAN DIENEN VOOR HET IDENTIFICEREN EN BEHANDELEN VAN RECHTSTREEKS MTT REDUCERENDE STOFFEN EN/OF STOFFEN DIE KLEURINTERFERENTIE VEROORZAKEN, OP BASIS VAN DE SOP VOOR VRMI



d.d. 26-09-2019

Europese Unie

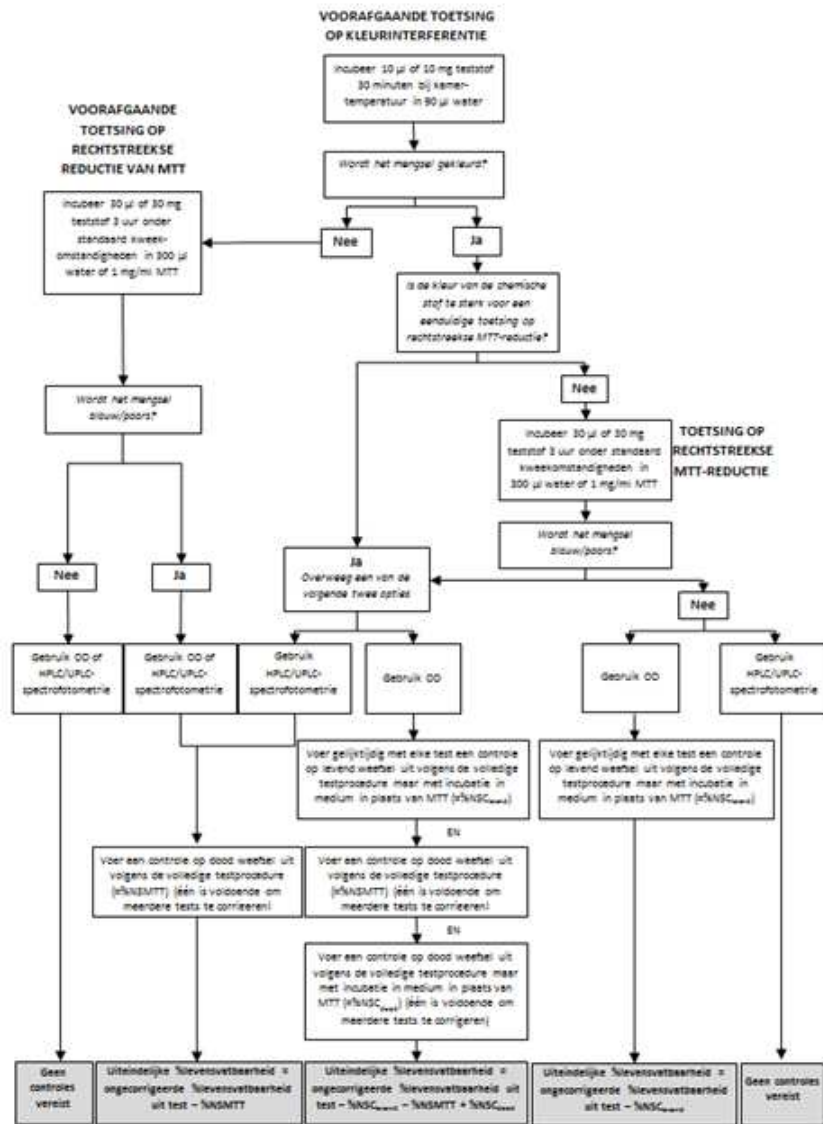
Publicatieblad van de

http://www.emis.vito.be



Aanhangsel 4

ILLUSTRATIEF STROOMSCHEMA DAT ALS LEIDRAAD KAN DIENEN VOOR HET IDENTIFICEREN EN BEHANDELEN VAN RECHTSTREEKS MTT REDUCERENDE STOFFEN EN/OF STOFFEN DIE KLEURINTERFERENTIE VEROOZAKEN, OP BASIS VAN DE SOP VOOR VRM2



Aanhangsel 5

KRITISCHE PARAMETERS EN AANVAARDBAARHEIDSCRITERIA VOOR KWALIFICATIES VAN EEN HPLC/UPLC-SPECTROFOTOMETRIESYSTEEM VOOR METING VAN UIT RHCE-WEEFSELPREPARATEN GEËXTRAHEERD MTT-FORMAZAN

Parameter	Protocol ontleend aan FDA-leidraad (36) (38)	Aanvaardbaarheidscriteria
Selectiviteit	Analyse van isopropanol, levende blanco (isopropanol-extract van onbehandelde levende RhCE-weefselpreparaten), dode blanco (isopropanol-extract van onbehandelde gedode RhCE-weefselpreparaten) en een kleurstof (bv. methyleenblauw)	Oppervlakte _{interferentie} ≤ 20 % van Oppervlakte _{LLOQ} ⁽¹⁾
Precisie	Kwaliteitscontroles (d.w.z. MTT-formazan bij 1,6 µg/ml, 16 µg/ml en 160 µg/ml) in isopropanol (n=5)	CV ≤ 15 % of ≤ 20 % voor de LLOQ
Nauwkeurigheid	Kwaliteitscontroles in isopropanol (n=5)	%Afw. ≤ 15 % of ≤ 20 % voor de LLOQ
Matrixeffect	Kwaliteitscontroles in levende blanco (n=5)	85 % ≤ %Matrixeffect ≤ 115 %
Carry-over	Analyse van isopropanol na een ULOQ ⁽²⁾ -standaard	Oppervlakte _{interferentie} ≤ 20 % van Oppervlakte _{LLOQ}
Reproduceerbaarheid (binnen één dag)	3 onafhankelijke kalibratiecurven (op basis van 6 achterevolgende 1/3 verdunningen van MTT-formazan in isopropanol beginnend bij de ULOQ, d.w.z. 200 µg/ml); Kwaliteitscontroles in isopropanol (n=5)	Kalibratiecurven: %Afw. ≤ 15 % of ≤ 20 % voor de LLOQ
Reproduceerbaarheid (van dag tot dag)	Dag 1: 1 kalibratiecurve en kwaliteitscontroles in isopropanol (n=3) Dag 2: 1 kalibratiecurve en kwaliteitscontroles in isopropanol (n=3) Dag 3: 1 kalibratiecurve en kwaliteitscontroles in isopropanol (n=3)	Kwaliteitscontroles: %Afw. ≤ 15 % en CV ≤ 15 %
Kortetermijnstabiliteit van MTT-formazan in RhCE-weefselextract	Kwaliteitscontroles op levende blanco (n=3) geanalyseerd op de dag van bereiding en na 24 uur bewaring bij kamertemperatuur	%Afw. ≤ 15 %
Langetermijnstabiliteit van MTT-formazan in RhCE-weefselextract, indien nodig	Kwaliteitscontroles op levende blanco (n=3) geanalyseerd op de dag van bereiding en na een aantal dagen bewaring bij -20 °C	%Afw. ≤ 15 %

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

⁽²⁾ ULOQ: bovenste bepaalbaarheids grens (Upper Limit of Quantification), gedefinieerd als ten minste tweemaal zo hoog als de hoogste verwachte MTT-formazanconcentratie in isopropanol-extracten van negatieve controles (~70 µg/ml in de VRM), d.w.z. 200 µg/ml.

B.70 IN-VITRO BEPALINGEN MET EEN MENSELIJKE RECOMBINANTE OESTROGEENRECEPTOR (hrER) VOOR HET OPSPOREN VAN CHEMISCHE STOFFEN MET ER-BINDINGSAFFINITEIT

ALGEMENE INLEIDING

Op prestaties gebaseerde testrichtlijn van de OESO

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 493 (2015) van de OESO. TG 493 is een op prestaties gebaseerde testrichtlijn (performance-based test guideline, PBTG), waarin de methodologie wordt beschreven voor menselijke recombinante in-vitrobepalingen (hrER) voor het opsporen van stoffen met oestrogeenreceptorbindingsaffiniteit (hrER-bindingsbepalingen). De PBTG omvat twee, in mechanistisch en functioneel opzicht gelijksoortige bepalingen voor het identificeren van oestrogeenreceptor- α -binders (ER α -binders) en moet de ontwikkeling bevorderen van nieuwe gelijksoortige of gewijzigde testmethoden die overeenstemmen met de valideringsbeginselen beschreven in de OESO-leidraad voor de validering en internationale aanvaarding van nieuwe of bijgewerkte bepalingen voor gevarenebeoordeling (Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment) (1) De volledig gevalideerde referentietestmethoden (aanhangsels 2 en 3) die de basis vormen voor deze op prestaties gebaseerde testrichtlijn zijn:

- de in-vitrobepaling van de binding aan de oestrogeenreceptor (ER) met een volledige menselijke recombinante ER α van Freyberger en Wilson (FW-bepaling) (2), en
- de in-vitrobepaling van de binding aan de oestrogeenreceptor met een menselijk recombinant ligandbindingsdomein-eiwit van het Japanse Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI-bepaling) (2).

Er zijn prestatienormen (3) beschikbaar om de ontwikkeling en validering van soortgelijke testmethoden voor het zelfde gevareneindpunt te vergemakkelijken en tijdige wijziging van PBTG 493 mogelijk te maken, zodat nieuwe, gelijksoortige bepalingen aan een bijgewerkte PBTG kunnen worden toegevoegd. Gelijksoortige testbepalingen zullen evenwel pas worden toegevoegd nadat de OESO ze heeft beoordeeld en onderschrijft dat aan de prestatienormen wordt voldaan. De in TG 493 opgenomen bepalingen kunnen zonder onderscheid worden gebruikt om te voldoen aan de eisen die aan OESO-landen worden gesteld wat betreft de testresultaten voor oestrogeenreceptorbinding, en in aanmerking te komen voor wederzijdse aanvaarding van gegevens in overeenstemming met de OESO-overeenkomst.

Achtergrond en beginselen van de bepalingen die in deze testmethode worden beschreven

2. In 1998 is de OESO met hoge prioriteit een actie gestart om bestaande testrichtlijnen te herzien en nieuwe testrichtlijnen te ontwikkelen voor het screenen en testen op potentiële hormoonontregelaars. Het conceptueel kader van de OESO voor het testen en beoordelen van hormoonontregelende stoffen werd in 2012 herzien. Het oorspronkelijke en het herziene conceptueel kader zijn als bijlagen opgenomen bij de leidraad voor gestandaardiseerde testrichtlijnen voor de beoordeling van chemische stoffen op hormoonontregeling (Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption) (4). Het conceptueel kader omvat vijf niveaus, die elk overeenkomen met een ander niveau van biologische complexiteit. De in deze testmethode beschreven ER-bindingsbepalingen zijn ingedeeld op niveau 2: „*in-vitrobepalingen die gegevens moeten opleveren over (een) geselecteerde endocriene mechanisme(n)/weg(en)*”. Deze testmethode betreft in-vitroreceptorbindingsbepalingen die zijn ontworpen voor het identificeren van liganden voor de menselijke oestrogeenreceptor- α (ER α).
3. De relevantie van de in-vitro-ER-bindingsbepaling voor biologische functies is genoegzaam aangetoond. ER-bindingsbepalingen zijn ontworpen voor het identificeren van chemische stoffen die in staat zijn het signaalpad van oestrogene hormonen te verstoren. Ze worden al twee decennia breed toegepast voor het karakteriseren van de weefsel-distributie van ER's en het identificeren van ER-agonisten/antagonisten. Deze bepalingen berusten op de interactie tussen ligand en receptor, die de eerste stap vormt van het signaalpad van oestrogenen en essentieel is voor de voortplantingsfunctie van alle gewervelden.

4. De interactie van oestrogenen met ER's kan de transcriptie van oestrogeengestuurde genen beïnvloeden en niet-genomische effecten veroorzaken, wat kan leiden tot de inductie of remming van processen in de cel, waaronder de processen die nodig zijn voor celproliferatie, de normale ontwikkeling van de foetus en de voortplantingsfunctie (5) (6) (7). Verstoring van de normale oestrogene systemen zou kunnen leiden tot schadelijke effecten op de normale ontwikkeling (ontogenese), de reproductieve gezondheid en de integriteit van het voortplantingsstelsel. Een verstoorde ER-signalering kan leiden tot effecten als een verhoogd risico van hormoonafhankelijke kanker, een verstoorde vruchtbaarheid en afwijkingen in de groei en ontwikkeling van de foetus (8).
5. In-vitro-bindingsbepalingen zijn gebaseerd op een directe interactie van een stof met de ligandbindingsplaats van een specifieke receptor die de gentranscriptie reguleert. De voornaamste component van de bindingsbepaling met een menselijke recombinante oestrogeenreceptor-alfa (hrERα) meet het vermogen van een radioactief gelabelde ligand ($[^3\text{H}]17\beta$ -oestradiol) om aan de ER te binden in aanwezigheid van oplopende concentraties van een teststof (een „competitor”). Teststoffen met een hoge affiniteit voor de ER concurreren in een lagere concentratie met de radioactief gelabelde ligand dan chemische stoffen met een lagere affiniteit voor de receptor. Deze bepaling heeft twee hoofdcomponenten: een bepaling van de verzadigingsbinding om de parameters van de receptor-ligandinteractie te bepalen en de ER-specificiteit te documenteren, gevolgd door een bepaling van de competitieve binding die de concurrentie tussen een teststof en een radioactief gelabelde ligand om binding aan de ER karakteriseert.
6. De relevantie en de betrouwbaarheid van de CERI-bindingsbepaling en de FW-bindingsbepaling voor het beoogde doel zijn aangetoond in de valideringsstudies voor deze bepalingen (2).
7. De in deze testmethode gebruikte definities en afkortingen staan in aanhangsel 1.

Toepassingsgebied en beperkingen voor de receptorbindingsbepalingen

8. Deze bepalingen worden aangereikt ten behoeve van screening en prioritering, maar kunnen ook informatie verschaffen voor een moleculaire inleidende gebeurtenis die kan worden gebruikt in een benadering met meervoudige bewijsvoering („weight of evidence”-benadering). De bepalingen berusten op de chemische binding aan het ligandbindingsdomein van de ERα in een in-vitrosysteem. De resultaten mogen dan ook niet rechtstreeks geëxtrapoleerd worden naar de complexe signalering en regulering van het intacte endocriene systeem in vivo.
9. De binding van de natuurlijke ligand, 17β -oestradiol, is de eerste stap in een reeks moleculaire gebeurtenissen die de transcriptie van doelgenen activeert en uiteindelijk uitmondt in een fysiologische verandering (9). Binding aan het ligandbindingsdomein van de ERα wordt daarom beschouwd als een van de voornaamste mechanismen voor ER-gemedieerde hormoonontregeling, hoewel er ook andere mechanismen zijn waardoor hormoonontregeling kan optreden, waaronder i) interacties met andere delen van de ERα dan de ligandbindingsplaats, ii) interacties met andere receptoren die bij het signaalpad van oestrogenen betrokken zijn, de ERβ en de G-proteïnegekoppelde ER, andere receptoren en enzymssystemen in het endocriene systeem, iii) hormoonsynthese, iv) metabole activering en/of inactivering van hormonen, v) verdeling van hormonen naar doelweefsels, en vi) klaring van hormonen uit het lichaam. In geen van de bepalingen die onder deze testmethode vallen, worden deze werkingsmechanismen in aanmerking genomen.

10. Deze testmethode richt zich op het vermogen van stoffen om aan de menselijke ER α te binden en maakt geen onderscheid tussen ER α -agonisten en ER α -antagonisten. Gebeurtenissen die op deze binding volgen, zoals gentranscriptie of fysiologische veranderingen, worden door deze bepalingen evenmin in aanmerking genomen. Aangezien bij de validering alleen zuivere stoffen zijn gebruikt die uit één bestanddeel bestaan, zijn er geen gegevens over de toepasbaarheid voor testmengsels. De bepalingen zijn in theorie evenwel toepasbaar voor het testen van stoffen die uit meerdere componenten bestaan en van mengsels. Voordat de testmethode wordt gebruikt op een mengsel om gegevens te genereren voor een beoogd regelgevingsdoel, moet worden nagegaan of, en zo ja, waarom deze methode betrouwbare resultaten oplevert voor dat doel. Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is.
11. De celvrije receptorsystemen hebben geen eigen metaboliseringscapaciteit en zijn niet gevalideerd in combinatie met metabole enzymactiviteit. Niettemin zou het mogelijk kunnen zijn om metabole activiteit in de opzet van een studie te integreren, maar dit zou wel nadere validering vereisen.
12. Chemische stoffen die het eiwit (d.w.z. receptoreiwit) kunnen denatureren, zoals oppervlakreactieve stoffen of chemische stoffen die de pH van de testbuffer veranderen, kunnen mogelijk niet worden getest of alleen bij concentraties waarbij dergelijke interacties niet optreden. In andere gevallen wordt het concentratiebereik waarin een teststof in deze bepalingen kan worden getest, beperkt door oplosbaarheid ervan in de testbuffer.
13. Ter informatie worden in tabel 1 de testresultaten weergegeven voor de 24 stoffen die zijn getest in beide volledig gevalideerde bepalingen die in deze testmethode worden beschreven. Op basis van de gepubliceerde verslagen, waaronder in-vitrobepalingen voor de transcriptionele activatie van de ER en/of de uterotrofe test, zijn 17 van deze stoffen ingedeeld als ER-binders en 6 als niet-binders (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Wat betreft de gegevens die zijn weergegeven in tabel 1 was er bijna 100 % overeenstemming tussen de beide bepalingen over de indeling van alle stoffen tot een concentratie van 10^{-4} M, en elke stof werd correct ingedeeld als ER-binder of niet-ER-binder. Nadere informatie over deze groep stoffen en over de aanvullende stoffen die tijdens de valideringsstudies voor de ER-bindingsbepalingen getest zijn, is te vinden in de prestatienormen voor de hrER-bindingsbepaling (3), aanhangsel 2 (tabellen 1, 2 en 3).

Tabel 1

Indeling van stoffen als ER-bindings of niet-ER-bindings op basis van de FW- en CER-ER-bindingsbepalingen, vergeleken met de verwachte respons

	Naam van de stof	CAS RN	Verwachte respons	FW-bepaling		CER-ER-bepaling		Chemische klasse volgens de MeSH	Productcategorie
				Concentratie-bereik (M)	Indeling	Concentratie-bereik (M)	Indeling		
1	17β-Oestradiol	50-28-2	Binder	1 × 10 ⁻¹¹ – 1 × 10 ⁻⁶	Binder	1 × 10 ⁻¹¹ – 1 × 10 ⁻⁶	Binder	Steroïde	Geneesmiddel, dier-geneesmiddel
2	Noretynodrel	68-23-5	Binder	3 × 10 ⁻⁹ – 30 × 10 ⁻⁴	Binder	3 × 10 ⁻⁹ – 30 × 10 ⁻⁴	Binder	Steroïde	Geneesmiddel, dier-geneesmiddel
3	Norethisteron	68-22-4	Binder	3 × 10 ⁻⁹ – 30 × 10 ⁻⁴	Binder	3 × 10 ⁻⁹ – 30 × 10 ⁻⁴	Binder	Steroïde	Geneesmiddel, dier-geneesmiddel
4	Di-n-butylftalaat	84-74-2	Niet-binder (*)	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻⁴	Niet-binder (**)	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻⁴	Niet-binder (**)	Koolwaterstof (cyclisch), ester	Weekmaker, chemisch tussenproduct
5	DES	56-53-1	Binder	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Binder	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Binder	Koolwaterstof (cyclisch), fenol	Geneesmiddel, dier-geneesmiddel
6	17α-Ethinylestradiol	57-63-6	Binder	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Binder	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Binder	Steroïde	Geneesmiddel, dier-geneesmiddel
7	meso-Hexestrol	84-16-2	Binder	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Binder	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Binder	Koolwaterstof (cyclisch), fenol	Geneesmiddel, dier-geneesmiddel
8	Genisteïne	446-72-0	Binder	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Binder	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Binder	Koolwaterstof (cyclisch), flavonoïde	Natuurlijk product
9	Equol	531-95-3	Binder	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Binder	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Binder	Fyto-oestrogenem-tablet	Natuurlijk product
10	Butylparabeen (n-butyl-4-hydroxybenzoesaat)	94-26-8	Binder	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Binder	1 × 10 ⁻¹⁰ – 1 × 10 ⁻³	Binder	Parabeen	Conservemiddel

	Naam van de stof	CAS RN	Verwachte respons	FW-bepaling		CERL-bepaling		Chemische klasse volgens de MeSH	Productcategorie
				Concentratie-bereik (M)	Indeling	Concentratie-bereik (M)	Indeling		
11	Nonylfenol (mengsel)	84852-15-3	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Alkylfenol	Tussenproduct
12	<i>o,p'</i> -DDT	789-02-6	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Organische chloorverbinding	Insecticide
13	Corticosteron	50-22-6	Niet-binder (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Niet-binder	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Niet-binder	Steroïde	Natuurlijk product
14	Zearalenon	17924-92-4	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Koolwaterstof (cyclisch), lacton	Natuurlijk product
15	Tamoxifen	10540-29-1	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Koolwaterstof (cyclisch)	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
16	5 α -dihydrotestosteron	521-18-6	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Steroïde, niet-fenolverbinding	Natuurlijk product
17	Bisfenol A	80-05-7	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Fenol	Chemisch tussenproduct
18	4- <i>n</i> -heptylfenol	1987-50-4	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Onduidelijk (a)	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Alkylfenol	Tussenproduct
19	Kepone (Chloordecon)	143-50-0	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Koolwaterstof (gehalogeneerd)	Pesticide
20	Benzo[<i>a</i>]antraceen	56-55-3	Niet-binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Niet-binder (b)	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Niet-binder (b)	Aromatische koolwaterstof	Tussenproduct
21	Enterolacton	78473-71-9	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Binder	Fyto-oestrogeen	Natuurlijk product
22	Progesteron	57-83-0	Niet-binder (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Niet-binder	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Niet-binder	Steroïde	Natuurlijk product

Naam van de stof	CAS RN	Verwachte respons	FW-bepaling		CERI-bepaling		Chemische klasse volgens de MeSH	Productcategorie
			Concentratie-bereik (M)	Indeling	Concentratie-bereik (M)	Indeling		
23 Octyltriethoxysilaan	2943-75-1	Niet-binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Niet-binder	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Niet-binder	Silaan	Oppervlakmodificator
24 Atrazine	1912-24-9	Niet-binder (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Niet-binder	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Niet-binder	Heterocyclische verbinding	Herbicide

(*) Oplosbaarheids grens $< 1 \times 10^{-4}$ M.

(**) Het gebruik en de indeling van di-n-butylfalaat (DBP) als niet-binder werden gebaseerd op tests bij concentraties tot 10^{-4} M, omdat sommige laboratoria tijdens de prevalideringsstudies hebben waargenomen dat de stof onoplosbaar is bij 10^{-5} M (bv. troebelheid).

(†) Tijdens de valideringsstudie werd di-n-butylfalaat (DBP) bij concentraties tot 10^{-3} M getest als gecodeerde teststof. Onder die omstandigheden namen sommige laboratoria een afname in de binding van de radioactief gelabelde ligand bij de hoogste concentratie (10^{-5} M) waar en/of een onzeker verloop van de curve. Voor deze testruns werd DBP door 3/5 laboratoria aan de hand van de CERI-bepaling en door 5/6 laboratoria aan de hand van de FW-bepaling als „onduidelijk” of als „binder” ingedeeld (zie referentie (2), secties IV.B.3a, b en VI.A).

(‡) Indeling kwam niet overeen met verwachte indeling. Doordat 4-n-heptylfenol door 3/5 laboratoria als „onduidelijk” of „niet-binder” werd ingedeeld, is de gemiddelde indeling uitgekomen op „onduidelijk”. Bij nadere inspectie bleek dat dit te wijten was aan een beperkte chemische oplosbaarheid, waardoor geen volledige bindingscurve kon worden verkregen.

(§) Tijdens de valideringsstudie werd de indeling van benzo[*a*]antracene veranderd in „niet-binder” (d.w.z. negatief) op basis van de gepubliceerde literatuur waarin wordt aangetoond dat de gerapporteerde oestrogene activiteit in vitro voor deze stof (16) voornamelijk afhankelijk is van de metabole activering ervan (17)(18). In de celvrije hrER-bindingsbepalingen zoals die in de interlaboratorium-valideringsstudies worden toegepast, is geen enzymatische metabole activering van de stof te verwachten. Wanneer deze stof wordt gebruikt onder de experimentele omstandigheden van de FW-bepaling en de CERI-bepaling, is de juiste indeling dan ook die van „niet-binder”.

COMPONENTEN VAN DE hrER-BINDINGSBEPALING

Essentiële componenten van de bepaling

14. Deze testmethode is van toepassing op bepalingen waarbij gebruikgemaakt wordt van een ER-receptor en een ligand die voldoende sterk aan de receptor bindt. Deze ligand kan als marker/tracer voor de bepaling worden gebruikt en kan worden verdreven met oplopende concentraties van de teststof. De twee hoofdcomponenten van bindingsbepalingen zijn: 1) verzadigingsbinding en 2) competitieve binding. De bepaling van de verzadigingsbinding wordt gebruikt ter bevestiging van de specificiteit en de activiteit van de receptorpreparaten en aan de hand van de competitievebindingsbepaling wordt het vermogen van de teststof om aan de hrER te binden beoordeeld.

Controles

15. De keuze van het referentie-oestrogeen en de controles, die gelijktijdig worden getest, moet worden onderbouwd. Gelijktijdige controles (oplosmiddel (vehiculum), positief (ER-binder; sterke en zwakke affiniteit) en negatief (niet-binder)), voor zover van toepassing, dienen als indicatie dat de bepaling werkt onder de testomstandigheden, en zorgen dat de verschillende experimenten met elkaar vergeleken kunnen worden. Ze maken doorgaans deel uit van de aanvaardbaarheidscriteria voor een bepaald experiment (1). Tijdens elke testrun moeten volledige concentratiecurven voor het referentie-oestrogeen en de controles (d.w.z. zwakke binder en niet-binder) in één plaat worden gebruikt. Alle andere platen moeten het volgende bevatten: i) een hoge concentratie (nagenoeg volledige verdrijving van de radioactief gelabelde ligand) en een middelhoge concentratie (bij benadering de IC_{50}) van zowel E2 als de zwakke binder in drievoud; ii) oplosmiddelcontrole en niet-specifieke binding, elk in drievoud.

Standaard kwaliteitscontroleprocedures

16. Voor elke bepaling moeten de standaard kwaliteitscontroleprocedures worden uitgevoerd zoals beschreven, om er zeker van te zijn dat de receptoren actief zijn, dat de chemische concentraties kloppen en dat de tolerantiegrenzen gedurende meerdere herhaalde bepalingen stabiel blijven, en het vermogen behouden om doorheen de tijd de verwachte ER-bindingsresponsen te geven.

Aantoning van de bekwaamheid van laboratoria

17. Alvorens onbekende chemische stoffen te testen met een van de bepalingen die onder deze testmethode vallen, moet elk laboratorium zijn bekwaamheid in het gebruik van de bepaling aantonen door verzadigingsbepalingen uit te voeren, ter bevestiging van de specificiteit en de activiteit van het ER-preparaat, en competitievebindingsbepalingen met het referentie-oestrogeen en de controles (zwakke binder en niet-binder). Het laboratorium moet een historische databank aanleggen met resultaten voor het referentie-oestrogeen en de controles, die zijn gegenereerd met 3-5 onafhankelijke, op verschillende dagen uitgevoerde experimenten. Deze experimenten zullen de basis vormen voor het referentie-oestrogeen en de historische controle voor het laboratorium en zullen mede worden gebruikt om de aanvaardbaarheid van de bepaling te beoordelen voor toekomstige testruns.
18. Door het testen van de in tabel 2 genoemde stoffen voor bekwaamheidstoetsing wordt ook de responsiviteit van het testsysteem bevestigd. De lijst van stoffen voor bekwaamheidstoetsing is een subset van de referentiestoffen die worden aangegeven in de prestatienormen voor de ER-bindingsbepalingen (3). Deze stoffen zijn in de handel verkrijgbaar, vertegenwoordigen chemische klassen waarbij doorgaans sprake is van ER-bindende activiteit, vertonen een geschikt potentiebereik voor de verwachte potentie van ER-binders (d.w.z. sterke tot zwakke binders) en niet-binders (d.w.z. negatieven). Voor elke stof voor bekwaamheidstoetsing moeten de geteste concentraties het bereik in tabel 2 bestrijken. Er moeten voor elke stof ten minste drie experimenten worden uitgevoerd en de resultaten moeten overeenstemmen met de verwachte chemische activiteit. Elk experiment moet onafhankelijk (d.w.z. met verse verdunningen van receptor, chemische stoffen en reagens) worden verricht, met elke concentratie in drievoud. De bekwaamheid wordt aangetoond door een correcte indeling (positief/negatief) van elke stof. De bekwaamheidstoetsing moet worden uitgevoerd door elke onderzoeker die de bepalingen leert.

Tabel 2

Lijst van controles en stoffen voor bekwaamheidstoetsing voor de competitieve hrER-bindingsbepalingen ⁽¹⁾

Nr.	Naam van de stof	CAS RN ⁽²⁾	Verwachte respons ⁽³⁾ ⁽⁴⁾	Testconcentratiebereik (M)	Chemische klasse volgens de MeSH ⁽⁵⁾	Productcategorie ⁽⁶⁾
Controles (referentie-oestrogenen, zwakke binder, niet-binder)						
1	17β-Oestradiol	50-28-2	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Steroïde	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
2	Noretynodrel (of) Norethisteron	68-23-5 (of) 68-22-4	Binder	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-6}$	Steroïde	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
3	Octyltriëthoxysilaan	2943-75-1	Niet-binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Silaan	Oppervlakmodifier

Stoffen voor bekwaamheidstoetsing ⁽⁶⁾

4	Diethylstilboestrol	56-53-1	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Koolwaterstof (cyclisch), fenol	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
5	17α-Ethinylestradiol	57-63-6	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Steroïde	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
6	meso-Hexestrol	84-16-2	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Koolwaterstof (cyclisch), fenol	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
7	Tamoxifen	10540-29-1	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Koolwaterstof (cyclisch)	Geneesmiddel, diergeneesmiddel
8	Genisteïne	446-72-0	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Heterocyclische verbinding, flavonoïde,	Natuurlijk product

Nr.	Naam van de stof	CAS RN ⁽²⁾	Verwachte respons ⁽³⁾ ⁽⁴⁾	Testconcentratiebereik (M)	Chemische klasse volgens de MeSH ⁽⁵⁾	Productcategorie ⁽⁶⁾
9	Bisfenol A	80-05-7	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Fenol	Chemisch tussenproduct
10	Zearalenon	17924-92-4	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Heterocyclische verbinding, lacton	Natuurlijk product
11	Butylparabeen	94-26-8	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Carbonzuur, fenol	Conserveermiddel
12	Atrazine	1912-24-9	Niet-binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Heterocyclische verbinding	Herbicide
13	Di-n-butylftalaat (DBP) ⁽⁷⁾	84-74-2	Niet-binder ⁽⁸⁾	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Koolwaterstof (cyclisch), ester	Weekmaker, Chemisch tussenproduct
14	Corticosteron	50-22-6	Niet-binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-4}$	Steroïde	Natuurlijk product

⁽¹⁾ Als een stof voor bekwaamheidstoetsing niet meer in de handel verkrijgbaar is, mag een stof met dezelfde indeling voor ER-binding en een vergelijkbare potentie en chemische klasse worden gebruikt.

⁽²⁾ Aftorkingen: CAS RN = registratienummer van de Chemical Abstracts Service.

⁽³⁾ Indeling als (niet-)ERa-binder in de valideringsstudie voor de CER1- en FW-hrER-bindingsoepalingen (2).

⁽⁴⁾ De ER-bindende activiteit is gebaseerd op de Background Review Documents (BRD) van het ICCVAM over bepalingen voor ER-binding en TA (9) en empirische gegevens en andere informatie uit de gepubliceerde en gereviewde onderzoeken die zijn geraadpleegd (10) (11) (12) (13) (14) (15).

⁽⁵⁾ De stoffen werden ingedeeld in een of meer chemische klassen aan de hand van de Medical Subject Headings (MeSH) van de Amerikaanse National Library of Medicine, een internationaal erkend gestandaardiseerd classificatiesysteem (beschikbaar op: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽⁶⁾ De stoffen werden ingedeeld in een of meer productcategorieën aan de hand van de Hazardous Substances Data Bank van de Amerikaanse National Library of Medicine (beschikbaar op: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDb>).

⁽⁷⁾ DBP kan als alternatieve niet-bindende controle worden gebruikt, wanneer wordt getest met een maximumconcentratie van 10^{-4} M.

⁽⁸⁾ De oplosbaarheidsgrenzen voor deze stof is 10^{-4} M. Het gebruik en de indeling van di-n-butylftalaat (DBP) als niet-binder zijn gebaseerd op tests bij concentraties tot 10^{-4} M, omdat sommige laboratoria tijdens de prevalideringsstudies hebben waargenomen dat de stof onoplosbaar is bij 10^{-3} M (bv. troebelheid).

Bepaling van de oplosbaarheid en het concentratiebereik van teststoffen

19. Er moet voor elke stof een inleidende test worden verricht om de oplosbaarheidsgrens vast te stellen en om het passende concentratiebereik te bepalen dat bij de uitvoering van de test moet worden aangehouden. De oplosbaarheidsgrens van elke teststof wordt eerst bepaald in het oplosmiddel en nader bevestigd onder de omstandigheden van de bepaling. De uiteindelijk in de bepaling te testen concentratie mag niet hoger zijn dan 1 mM. De bereikbepalingstest bestaat uit een oplosmiddelcontrole samen met een logaritmische reeks van acht verdunningen, beginnend bij de maximaal aanvaardbare concentratie (bv. 1 mM of lager, afhankelijk van de oplosbaarheidsgrens), waarbij de aanwezigheid van troebelheid of neerslag moet worden opgemerkt. In het tweede en het derde experiment moeten de concentraties voor zover nodig worden aangepast om de concentratie-responscurve beter te kunnen karakteriseren.

Aanvaardbaarheidscriteria voor de testrun

20. Of een testrun aanvaard of verworpen wordt, hangt af van de beoordeling van de resultaten voor het referentie-oestrogeen en de controle die voor elk experiment worden gebruikt. Allereerst moeten voor plaat 1 de volledige concentratiecurven voor de referentiecontroles die in elk experiment worden verkregen, voldoen aan de prestatie-eisen op basis van de curvefittingsparameters (bv. IC_{50} en Hill-coëfficiënt) die voortvloeien uit de gerapporteerde resultaten voor de protocollen van de CERI-bepaling en de FW-bepaling (aanhangsels 2 en 3), en de historische controlegegevens van het laboratorium dat de test verricht. Voor elk experiment moeten alle controles (referentie-oestrogeen, zwakke binder en niet-binder) correct zijn ingedeeld. Ten tweede moeten de controles op alle andere platen worden beoordeeld op overeenkomst met plaat 1. Er moet een voldoende breed concentratiebereik van de teststof worden gebruikt om de top van de competitiebindingscurve duidelijk te kunnen bepalen. De variabiliteit tussen de duplo's van elke concentratie van de teststof en tussen de drie onafhankelijke testruns moet binnen redelijke grenzen blijven en wetenschappelijk verdedigbaar zijn. Het laboratorium moet aantonen de bepaling consistent te kunnen uitvoeren door een historische databank van het referentie-oestrogeen en de controles op te zetten en bij te houden. Als maatstaf voor de intralaboratoriumreproduceerbaarheid kunnen de standaarddeviaties (SD) of variatiecoëfficiënten (CV) van de gemiddelden van de curvefittingsparameters voor het referentie-oestrogeen en de zwakkebindercontrole van meerdere experimenten worden gebruikt. De resultaten van de plaatcontroles van elke testrun en voor elke teststof moeten worden geëvalueerd op basis van professioneel oordeel.

Bovendien moet aan de volgende beginselen in verband met de aanvaardbaarheidscriteria worden voldaan:

- de gegevens moeten volstaan voor een kwantitatieve beoordeling van de ER-binding;
- de geteste controles moeten binnen het oplosbaarheidsbereik van de teststof blijven.

Analyse van de gegevens

21. Voor de analyse van de gegevens voor verzadigingsbinding en competitieve binding moet een procedure worden vastgesteld die voldoet aan de grondbeginselen voor de karakterisering van receptor-ligand-interacties. De gegevens voor verzadigingsbinding worden doorgaans geanalyseerd aan de hand van een niet-lineairregressiemodel dat zowel de totale als de niet-specifieke binding in aanmerking neemt. Bij de bepaling van B_{max} - en K_d -gegevens kan het nodig zijn om een correctie voor liganddepletie toe te passen (bv. Swillens, 1995 (19)). De gegevens voor competitieve binding worden doorgaans getransformeerd (bv. percentage specifieke binding en concentratie van de teststof ($\log M$)). De $\log(IC_{50})$ van elke teststof moet worden geschat met behulp van software voor niet-lineaire fitting van de curve die geschikt is voor het fitten van een Hill-vergelijking met vier parameters. Na een eerste analyse worden de curvefittingsparameters bepaald en wordt visueel geverifieerd hoe goed de bindingsgegevens overeenkomen met de gegenereerde competitiebindingscurve. In sommige gevallen kan voor een optimaal gefitte curve een aanvullende analyse nodig zijn (bv. door de top en/of de basis van de curve te begrenzen, de regel van 10 % toe te passen, zie aanhangsel 4 en referentie 2 (sectie III.A.2)).
22. Als aan de aanvaardbaarheidscriteria (punt 20) wordt voldaan, betekent dit weliswaar dat het systeem van de bepaling naar behoren functioneert, maar wil dit nog niet zeggen dat een bepaalde test kloppende gegevens produceert. Het reproduceren van de correcte resultaten van de eerste test is de beste indicatie dat de geproduceerde gegevens kloppen.

Algemene criteria voor gegevensinterpretatie

23. Er is op vooralsnog geen algemeen erkende methode voor het interpreteren van ER-bindingsgegevens, maar kwalitatieve (bv. binder/niet-binder) en/of kwantitatieve (bv. $\log IC_{50}$, relatieve bindingsaffiniteit (RBA) enz.) beoordelingen van ER-gemedieerde activiteit moeten wel steunen op empirische gegevens en wetenschappelijk verantwoorde afwegingen.

Testverslag

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

Bepaling:

- de gebruikte bepaling;

Controle-/referentie-/teststof:

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

Stof die uit één component bestaat:

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

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

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

Oplosmiddel/vehiculum:

- karakterisering (aard, leverancier en partij);
- motivering voor de keuze van het oplosmiddel/vehiculum;
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/vehiculum, indien bekend.

Receptoren:

- bron van de receptoren (leverancier, catalogusnummer, partij, type receptor, door de leverancier opgegeven concentratie actieve receptoren, certificering van de leverancier);

- karakterisering van de receptoren (o.a. resultaten verzadigingsbinding): K^d , B_{max} ,
- wijze van bewaren van de receptoren.
- *Radioactief gelabelde ligand:*
- leverancier, catalogusnummer, partij, specifieke activiteit.

Testomstandigheden:

- beperkte oplosbaarheid onder testomstandigheden;
- samenstelling van de bindingsbuffer;
- concentratie van de receptor;
- concentratie van de tracer (d.w.z. de radioactief gelabelde ligand);
- concentraties van de teststof;
- percentage vehiculum in de definitieve bepaling;
- incubatietemperatuur en -tijd;
- methode voor het scheiden van gebonden en vrije liganden;
- positieve en negatieve controles/referentiestoffen;
- criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is.

Aanvaardbaarheidscontrole:

- werkelijke waarden van de IC_{50} en de Hill-coëfficiënt voor de gelijktijdige positieve controles/referentiestoffen.

Resultaten:

- ruwe gegevens en gegevens over gebonden/vrije liganden;
- denatureringscontrole, indien uitgevoerd;
- in voorkomend geval, de laagste effectieve concentratie (LEC);
- RBA- en/of IC_{50} -waarden, indien van toepassing;
- indien mogelijk het verband tussen concentratie en respons;
- statistische analyses, indien uitgevoerd, samen met een maat voor de fout en de betrouwbaarheid (bv. standaardfout van het gemiddelde, standaarddeviatie, variatiecoëfficiënt of 95 %-betrouwbaarheidsinterval) en beschrijving van de wijze waarop deze waarden zijn verkregen.

Bespreking van de resultaten:

— toepassing van de regel van 10 %.

*Conclusie***LITERATUUR**

- (1) OESO (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.
- (2) OESO (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.
- (3) OESO (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.
- (4) OESO (2012). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.
- (5) Cavaillès V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, *Climacteric*, 5 Suppl 2: p.20-6.
- (6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer.*, 16(4): p. 1073-89.
- (7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): p. 63-6.
- (8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, *Endo Rev* 30(4):293-342.
- (9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.
- (10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 225-231.

- (13) OESO (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.
- (14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. p. 1-188.
- (15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, *Toxicol. Letters*, 146: 111-120.
- (16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol. Letters*, 180: 213-221.
- (17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, 196: 58-67.
- (18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. *Chemosphere*, 34: 835-848.
- (19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, *Mol Pharmacol* 47(6):1197-1203.

Aanhangsel 1

DEFINITIES EN AFKORTINGEN

Aanvaardbaarheidscriteria: minimumnormen voor de prestaties van experimentele controles en referentiestandaarden. Wil een experiment geldig zijn, dan moet aan alle aanvaardbaarheidscriteria worden voldaan.

Bekwaamheid: het bewezen vermogen om een bepaling naar behoren uit te voeren alvorens over te gaan tot het testen van onbekende stoffen.

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

Chemische stof: een stof of een mengsel.

Conceptueel kader: het conceptueel kader van de OESO voor het testen en beoordelen van hormoonontregelende stoffen.

CV: variatiecoëfficiënt.

E2: 17 β -oestradiol.

ER: oestrogenreceptor.

hER α : humane oestrogenreceptor-alfa.

Gevalideerde testmethode: een bepaling waarvoor valideringsstudies zijn gedaan om de relevantie (inclusief nauwkeurigheid) en betrouwbaarheid voor een bepaald doel te bepalen. Er moet worden opgemerkt dat een gevalideerde testmethode niet per definitie voldoende nauwkeurig en betrouwbaar is om aanvaardbaar te worden bevonden voor het voorgestelde doel (1).

Hormoonontregeling: de verstoring van de synthese, de opslag en het metabolisme van hormonen.

IC₅₀: de effectieve-concentratie van een remmende teststof.

ICCVAM: het Amerikaanse Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods.

Interlaboratoriumreproduceerbaarheid: een maatstaf voor de mate waarin verschillende gekwalificeerde laboratoria die gebruikmaken van hetzelfde protocol en die dezelfde stoffen testen, in kwalitatief en kwantitatief opzicht vergelijkbare resultaten kunnen produceren. De interlaboratoriumreproduceerbaarheid wordt bepaald tijdens de prevaliderings- en valideringsprocessen en geeft aan in hoeverre een bepaling met succes tussen laboratoria kan worden overgedragen; dit wordt ook wel reproduceerbaarheid tussen laboratoria genoemd (1).

Intralaboratoriumreproduceerbaarheid: een bepaling van de mate waarin gekwalificeerde mensen binnen hetzelfde laboratorium met succes resultaten kunnen repliceren met gebruikmaking van een specifiek protocol op verschillende tijdstippen. Dit wordt ook „reproduceerbaarheid binnen laboratoria” genoemd (1).

LEC: de laagste effectieve concentratie is de laagste concentratie van de teststof die een respons opwekt (d.w.z. de laagste concentratie van de teststof waarbij de x-voudige inductie statistisch verschilt van de gelijktijdige vehiculumcontrole).

„Me too”-test: een informele uitdrukking voor een bepaling die in structureel en functioneel opzicht vergelijkbaar is met een gevalideerde en geaccepteerde testmethode. Dit is een alternatieve benaming voor gelijksoortige testmethode.

Nauwkeurigheid (concordantie): de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de bepaling en erkende referentiewaarden. Het is een maat voor de prestaties van de bepaling en één aspect van relevantie. Deze term en de term „concordantie”, waaronder het percentage correcte uitkomsten van een bepaling wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt (1).

Oestrogene activiteit: het vermogen van een chemische stof om 17β -oestradiol na te bootsen voor wat betreft de mogelijkheid om aan oestrogenreceptoren te binden. Met deze testmethode kan de binding aan de hER α worden gedetecteerd.

PBTG: op prestaties gebaseerde testrichtlijn.

Prestatienormen: normen, gebaseerd op een gevalideerde testmethode, die de basis vormen voor de beoordeling van de vergelijkbaarheid van een voorgestelde, in mechanistisch en functioneel opzicht gelijksoortige bepaling. Dit zijn 1) essentiële componenten van de bepaling; 2) een minimumlijst van referentiestoffen die zijn gekozen uit de stoffen die zijn gebruikt om de aanvaardbare prestaties van de gevalideerde testmethode aan te tonen, en 3) de vergelijkbare nauwkeurigheds- en betrouwbaarheidsniveaus die door de voorgestelde bepaling moeten worden gehaald wanneer ze worden beoordeeld aan de hand van de minimumlijst van referentiestoffen; deze waarden zijn gebaseerd op de waarden die voor de gevalideerde testmethode zijn verkregen (1).

RBA: relatieve bindingsaffiniteit. De RBA van een stof wordt berekend als een percentage van de $\log(IC_{50})$ voor de stof ten opzichte van de $\log(IC_{50})$ voor 17β -oestradiol.

Referentie-oestrogeen: 17β -oestradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referentietestmethoden: de bepalingen waarop PBTG 493 gebaseerd is.

Regel van 10 %: optie om datapunten van de analyse uit te sluiten waarbij het gemiddelde percentage specifiek gebonden [3H] 17β -oestradiol van de duplo's 10 % of meer boven het gemiddelde van de waargenomen binding bij een lagere concentratie ligt (zie aanhangsel 4).

Relevantie: beschrijving van het verband van een bepaling met het te onderzoeken effect en of de bepaling betekenis heeft en nuttig is voor een bepaald doel. Het is de mate waarin de bepaling het te onderzoeken biologische effect correct meet of voorspelt. Relevantie omvat een beoordeling van de nauwkeurigheid (concordantie) van een bepaling (1).

SD: standaarddeviatie.

Stoffen voor bekwaamheidstoetsing: een subset van de referentiestoffen die in de prestatienormen zijn opgenomen. Laboratoria kunnen deze stoffen gebruiken om hun technische bekwaamheid met de gestandaardiseerde bepaling aan te tonen. Doorgaans zijn de selectiecriteria voor deze stoffen onder meer dat ze het hele spectrum van responsen bestrijken, dat ze in de handel verkrijgbaar zijn en dat er kwalitatief hoogwaardige referentiegegevens beschikbaar zijn.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

Validering: het proces om de betrouwbaarheid en de relevantie van een bepaald(e) benadering, methode, bepaling, proces of beoordeling voor een bepaald doel vast te stellen (1).

Aanhangsel 2

DE IN-VITROBEPALING VAN DE VERZADIGINGSBINDING EN COMPETITIEVE BINDING AAN DE OESTROGEENRECEPTOR (ERA)
MET EEN VOLLEDIGE RECOMBINANTE ERA VAN FREYBERGER EN WILSON

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN (ZIE OOK ALGEMENE INLEIDING)

1. Bij deze in-vitrobepaling van de verzadigingsbinding en competitieve binding aan de oestrogeenreceptor (ER α) wordt gebruikgemaakt van een volledige menselijke ER α (hrER α) die wordt geproduceerd in en geïsoleerd uit met baculovirus geïnfecteerde insectencellen. Het protocol, dat werd ontwikkeld door Freyberger en Wilson, is aan een internationale valideringsstudie in meerdere laboratoria (2) onderworpen, die de relevantie en de betrouwbaarheid van het protocol voor het beoogde doel van de bepaling heeft aangetoond.
2. Deze bepaling is een screeningsprocedure voor het identificeren van stoffen die aan de volledige hrER α kunnen binden, en wordt gebruikt voor het bepalen van het vermogen van een teststof om met 17 β -oestradiol te concurreren om binding aan de hrER α . De kwantitatieve resultaten van de bepaling kunnen onder meer de IC₅₀ (een maat voor de concentratie waarbij een teststof de helft van het [³H]-17 β -oestradiol van de hrER α verdrijft) en de relatieve bindingsaffiniteiten van de teststoffen voor de hrER α ten opzichte van 17 β -oestradiol omvatten. Ten behoeve van de screening van een chemische stof kunnen aanvaardbare kwalitatieve resultaten van de bepaling onder meer bestaan in de indeling van teststoffen als hrER α -binders, niet-binders, of onduidelijk op basis van criteria die zijn vastgesteld voor de bindingscurven.
3. Omdat voor de bepaling een radioactief gelabelde ligand wordt gebruikt, heeft het laboratorium een vergunning voor het werken met radioactieve stoffen nodig. Alle procedures met radio-isotopen en gevaarlijke chemische stoffen moeten voldoen aan de regelgeving en procedures zoals beschreven door nationale wetgeving.
4. Alvorens deze bepaling te gebruiken met het oog op regelgeving, moeten de **ALGEMENE INLEIDING** en **COMPONENTEN VAN DE hrER-BINDINGSBEPALING** worden geraadpleegd. De in deze TG gebruikte definities en afkortingen staan in aanhangsel 1.

BEGINSELEN VAN DE BEPALING (ZIE OOK DE ALGEMENE INLEIDING)

5. De bindingsbepaling met hrER α meet het vermogen van een radioactief gelabelde ligand ([³H]17 β -oestradiol) om aan de ER te binden in aanwezigheid van oplopende concentraties van een teststof (een competitor). Teststoffen met een hoge affiniteit voor de ER concurreren in een lagere concentratie met de radioactief gelabelde ligand dan chemische stoffen met een lagere affiniteit voor de receptor.
6. Deze bepaling heeft twee hoofdcomponenten: een bepaling van de verzadigingsbinding om de parameters van de receptor-ligandinteractie te bepalen, gevolgd door een bepaling van de competitieve binding die de concurrentie tussen een teststof en een radioactief gelabelde ligand om binding aan de ER karakteriseert.
7. De bepaling van de verzadigingsbinding is bedoeld om de bindingsaffiniteit en het aantal receptoren in een bepaalde partij te bepalen, ter voorbereiding van de bepaling van de competitieve binding. Bij de bepaling van de verzadigingsbinding worden in een evenwichtstoestand de affiniteit van een vaste concentratie oestrogeenreceptoren voor hun natuurlijke ligand (uitgedrukt als de dissociatieconstante K_d) en de concentratie actieve receptorplaatsen (B_{max}) gemeten.
8. Bij de bepaling van de competitieve binding wordt de affiniteit van een stof om met [³H]17 β -oestradiol te concurreren om binding aan de ER gemeten. De affiniteit wordt gekwantificeerd door de concentratie waarbij de teststof, in een evenwichtstoestand, 50 % remming van de specifieke binding van [³H]17 β -oestradiol veroorzaakt (de zogenaamde inhibitory concentration 50 % of IC₅₀). Ze kan ook worden beoordeeld met behulp van de relatieve bindingsaffiniteit (RBA) ten opzichte van de IC₅₀ van oestradiol, onafhankelijk gemeten in dezelfde testrun. Bij de bepaling van de competitieve binding wordt de binding van [³H]17 β -oestradiol in een vaste concentratie gemeten in aanwezigheid van een breed spectrum (acht orden van grootte) aan teststofconcentraties. De gegevens worden vervolgens, voor zover mogelijk, gefit tot een vorm van de Hill-vergelijking (Hill, 1910) die de verdringing van de radioactief gelabelde ligand door een competitieve binder voor één bindingsplaats beschrijft. De mate van verdringing van radioactief gelabeld oestradiol in evenwicht wordt gebruikt om de teststof te karakteriseren als een binder, een niet-binder of een stof met een onduidelijke respons.

PROCEDURE

Aantoning van aanvaardbare prestaties van het eiwit hrERa

9. Voorafgaand aan de routinematige uitvoering van de bepalingen van de verzadigingsbinding en de competitieve binding moet voor elke nieuwe partij hrERa worden aangetoond dat deze correct presteert in het laboratorium waar de partij zal worden gebruikt. Het proces om de prestaties aan te tonen bestaat uit de volgende twee stappen:
- een bepaling van de verzadigingsbinding met [³H]-17β-oestradiol om de specificiteit en de verzadiging voor hrERa aan te tonen. Met behulp van een niet-lineaire regressieanalyse van deze gegevens (bv. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) en de daaruit afgeleide Scatchard-plot worden de bindingsaffiniteit voor hrERa van [³H]-17β-oestradiol (K_d) en het aantal receptoren (B_{max}) voor elke partij hrERa gedocumenteerd;
 - een bepaling van de competitieve binding met de controlestoffen (het referentie-oestrogeen (17β-oestradiol)), een zwakke binder (bv. noretynodrel of norethisteron), en een niet-binder (octyltriëthoxysilaan, OTES). Elk laboratorium moet een historische databank aanleggen om de consistentie van de IC_{50} en andere relevante waarden voor het referentie-oestrogeen en de zwakke binder tussen de experimenten en de verschillende partijen hrERa te documenteren. De parameters van de competitievebindingscurven voor de controlestoffen moeten binnen de grenzen van het 95 %-betrouwbaarheidsinterval (zie tabel 1) blijven, die werden vastgesteld op basis van gegevens van de laboratoria die aan de valideringsstudie voor deze bepaling hebben deelgenomen (2).

Tabel 1

Prestatiecriteria voor het referentie-oestrogeen en de zwakke binder in de FW-hrER-bindingbepaling

Stof	Parameter	Gemiddelde (a)	Standaarddeviatie (n)	95 %-Betrouwbaarheidsintervallen (b)	
				Ondergrens	Bovengrens
17β-Oestradiol	Top (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Basis (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hill-coëfficiënt	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	LogIC ₅₀ (M)	-8,92 (c)	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Noretynodrel	Top (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Basis (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hill-coëfficiënt	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	LogIC ₅₀ (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Norethisteron ^c	Top (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Basis (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hill-coëfficiënt	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	LogIC ₅₀ (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

(a) Gemiddelde waarden (n) ± standaarddeviatie (SD) zijn berekend aan de hand van de geschatte curvefittingparameters (Hill-vergelijking met vier parameters) voor de controleteststrans die zijn uitgevoerd in vier laboratoria tijdens de valideringsstudie (zie bijlage N van referentie 2).

(b) Deze 95 %-betrouwbaarheidsintervallen zijn bedoeld ter oriëntatie voor aanvaardbaarheidscriteria.

(c) In de valideringsstudie was het testen van norethisteron optioneel voor Subtask 4 (zie referentie 2, Subtask 4). De gemiddelde waarden ± SD (n) werden daarom berekend aan de hand van de geschatte curvefittingparameters (Hill-vergelijking met vier parameters) voor de controleteststrans die werden uitgevoerd in twee laboratoria.

Het IC_{50} -bereik zal afhangen van de K_d van het receptorpreparaat en de concentratie radioactief ligand die in elk laboratorium worden gebruikt. Het is aanvaardbaar om het IC_{50} -bereik aan te passen op basis van de omstandigheden bij de uitvoering van de bepaling.

Aantoning van de bekwaamheid van laboratoria

10. Zie de punten 17 en 18 en tabel 2 in **COMPONENTEN VAN DE hrER-BINDINGSBEPALING** van deze testmethode. Elke bepaling (verzadigingsbinding en competitieve binding) moet bestaan uit drie onafhankelijke testruns (d.w.z. met verse verdunningen van receptor, chemische stoffen en reagentia) op verschillende dagen, en elke testrun moet drie duplo's omvatten.

Bepaling van de concentratie van de receptor (hrER α)

11. De concentratie actieve receptoren varieert enigszins, afhankelijk van de partij en de bewaaromstandigheden. Daarom moet de concentratie actieve receptoren in de door de leverancier geleverde partij worden bepaald. Daarmee wordt de precieze concentratie actieve receptoren op het moment van de testrun verkregen.
12. Onder de omstandigheden van de bepaling van de competitieve binding (d.w.z. 1 nM [^3H]-oestradiol) worden nominale concentraties van 0,25, 0,5, 0,75 en 1 nM receptor geïncubeerd in afwezigheid (totale binding) en aanwezigheid (niet-specifieke binding) van 1 μM ongelabeld oestradiol. De specifieke binding, berekend als het verschil tussen de totale en de niet-specifieke binding, wordt uitgezet tegen de nominale receptorconcentratie. Uit de receptorconcentratie waarbij de waarden voor de specifieke binding overeenkomen met 20 % van de toegevoegde radioactief gelabelde ligand kan de nominale receptorconcentratie worden afgeleid en deze moet worden gebruikt voor de bepalingen van de verzadigingsbinding en de competitieve binding. Vaak voldoet een hrER-eindconcentratie van 0,5 nM aan deze voorwaarde.
13. Als herhaaldelijk niet aan het 20 %-criterium kan worden voldaan, moet de proefopzet worden gecontroleerd op eventuele fouten. Dat het 20 %-criterium niet wordt gehaald, kan erop wijzen dat er zeer weinig actieve receptor in de recombinante partij aanwezig is. In dat geval moet worden overwogen een andere receptorpartij te gebruiken.

Verzadigingsbepaling

14. Er moeten acht ooplopende concentraties [^3H]-17 β -oestradiol in drievoud worden beoordeeld onder de volgende drie omstandigheden (zie tabel 2):
 - in afwezigheid van ongelabeld 17 β -oestradiol en in aanwezigheid van ER. Dit is de bepaling van de totale binding door meting van de radioactiviteit in de putjes die alleen [^3H]-17 β -oestradiol bevatten;
 - in aanwezigheid van een concentratie ongelabeld 17 β -oestradiol die 1 000 maal hoger is dan die van gelabeld 17 β -oestradiol en in aanwezigheid van ER. De bedoeling hiervan is om de actieve bindingssites te verzadigen met ongelabeld 17 β -oestradiol en vervolgens door de radioactiviteit in de putjes te meten, de niet-specifieke binding te bepalen. Van al het resterende gelabelde ('heet') oestradiol dat aan de receptor kan binden, wordt aangenomen dat het aan een niet-specifieke bindingsplaats bindt, omdat het ongelabelde oestradiol ('koud') in een dermate hoge concentratie aanwezig is dat het alle beschikbare specifieke bindingsplaatsen op de receptor inneemt;
 - in afwezigheid van ongelabeld 17 β -oestradiol en in afwezigheid van ER (bepaling van de totale radioactiviteit).

Bereiding van de oplossingen van [^3H]-17 β -oestradiol en ongelabeld 17 β -oestradiol

15. De verdunningen van [^3H]-17 β -oestradiol moeten worden bereid door toevoeging van testbuffer aan een 12 nM stamoplossing van [^3H]-17 β -oestradiol om zo concentraties te verkrijgen die in eerste instantie oplopen van 0,12 nM tot 12 nM. De uiteindelijke testconcentraties, olopend van 0,03 tot 3,0 nM, worden verkregen door 40 μl van deze oplossingen toe te voegen aan de opeenvolgende testputjes van een microtiterplaat met 96 putjes (in een eindvolume van 160 μl). De bereiding van de testbuffer en van de stamoplossing en de verdunningen van [^3H]-17 β -oestradiol en de bepaling van de concentraties worden uitvoerig beschreven in het protocol van de FW-bepaling, evenals de bepaling van de concentraties (2).
16. De verdunningen van 17 β -oestradiol in ethanol moeten worden bereid door toevoeging van testbuffer om zo acht concentraties te verkrijgen die in eerste instantie oplopen van 0,06 μM tot 6 μM . De uiteindelijke testconcentraties, olopend van 0,03 tot 3,0 μM , worden verkregen door 80 μl van deze oplossingen toe te voegen aan de opeenvolgende testputjes van een microtiterplaat met 96 putjes (in een eindvolume van 160 μl). De eindconcentraties ongelabeld 17 β -oestradiol in elk testputje voor de bepaling van de niet-specifieke binding moeten 1 000 maal zo hoog zijn als de concentratie [^3H]-17 β -oestradiol. De bereiding van de verdunningen van ongelabeld 17 β -oestradiol wordt uitvoerig beschreven in het protocol van de FW-bepaling (2).

17. Voor de bepaling wordt de nominale receptorconcentratie gebruikt, waarmee een specifieke binding van $20 \pm 5\%$ wordt verkregen (zie de punten 12-13). De hrER α -oplossing moet vlak voor gebruik worden bereid.
18. De 96-putjesplaten worden ingedeeld zoals weergegeven in tabel 2, met elke concentratie in drievoud. In aanhangsel 2.2 wordt een voorbeeld gegeven van de concentraties en volumes [^3H]-17 β -oestradiol, ongelabeld 17 β -oestradiol, buffer en receptor per testputje.

Tabel 2

Microtiterplaatindeling voor de bepaling van de verzadigingsbinding

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^3H]-E2+ ER			0,06 nM [^3H]-E2+ ER			0,08 nM [^3H]-E2+ ER			0,10 nM [^3H]-E2+ ER			Totale binding (oplossingsmiddel)
B	0,30 nM [^3H]-E2+ ER			0,60 nM [^3H]-E2+ ER			1,0 nM [^3H]-E2+ ER			3,0 nM [^3H]-E2+ ER			
C													
D	0,03 nM [^3H]-E2+ ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [^3H]-E2+ ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [^3H]-E2+ ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [^3H]-E2+ ER + 0,10 μM E2			Niet-specifieke binding
E	0,30 nM [^3H]-E2+ ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [^3H]-E2+ ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [^3H]-E2+ ER + 1,0 μM E2			3,0 nM [^3H]-E2+ ER + 3,0 μM E2			
F													
G													
H													

[^3H]-E2: [^3H]-17 β -oestradiol

ER: oestrogenreceptor

E2: ongelabeld 17 β -oestradiol

19. De testplaten moeten 16 tot 20 uur worden geïncubeerd bij 2 tot 8 °C en moeten gedurende de incubatieperiode op een schudder worden geplaatst.

Meting van aan de hrER α gebonden [^3H]-17 β -oestradiol

20. Het aan de hrER α gebonden [^3H]-17 β -oestradiol wordt gescheiden van het vrije [^3H]-17 β -oestradiol door aan elk putje 80 μl koude DCC-suspensie toe te voegen, de microtiterplaten 10 minuten te schudden en vervolgens 10 minuten te centrifugeren bij ongeveer 2 500 rpm. Om te voorkomen dat tijdens dit proces het gebonden [^3H]-17 β -oestradiol loskomt van de hrER α is het van cruciaal belang dat de buffers en de testputjes voortdurend op een temperatuur van 2 tot 8 °C worden gehouden en dat elke stap snel wordt uitgevoerd. Om de platen efficiënt en snel te kunnen verwerken is een schudder voor microtiterplaten nodig.
21. Vervolgens moet er uiterst voorzichtig, om verontreiniging van de putjes door aanraking van de DCC te vermijden, 50 μl van het supernatans met aan de hrER α gebonden [^3H]-17 β -oestradiol worden overgebracht naar een tweede microtiterplaat.
22. Aan elk putje wordt dan 200 μl van een scintillatievloeistof toegevoegd die de kinetische energie van de kernemissies in lichtenergie kan omzetten (A1-B12 en D1 tot E12). De putjes G1-H12 (aangeduid als totaal in dpm) staan een reeks verdunningen van [^3H]-17 β -oestradiol (40 μl) die direct moeten worden toegevoegd aan de scintillatievloeistof in de putjes van de meetplaat zoals aangegeven in tabel 3. Deze putjes bevatten dus alleen maar 200 μl scintillatievloeistof en de passende verdunning van [^3H]-17 β -oestradiol. Deze metingen tonen aan hoeveel [^3H]-17 β -oestradiol er, uitgedrukt in dpm, werd toegevoegd aan elke reeks putjes voor de totale binding en de niet-specifieke binding.

Tabel 3

Microtiterplaatindeling voor de bepaling van de verzadigingsbinding, meting van de radioactiviteit

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [³ H]-E2+ ER			0,06 nM [³ H]-E2+ ER			0,08 nM [³ H]-E2+ ER			0,10 nM [³ H]-E2+ ER			Totale binding (oplosmiddel)
B	0,30 nM [³ H]-E2+ ER			0,60 nM [³ H]-E2+ ER			1,0 nM [³ H]-E2+ ER			3,0 nM [³ H]-E2+ ER			
C	0,03 nM [³ H]-E2+ ER + 0,03 µM E2			0,06 nM [³ H]-E2+ ER + 0,06 µM E2			0,08 nM [³ H]-E2+ ER + 0,08 µM E2			0,10 nM [³ H]-E2+ ER + 0,10 µM E2			Niet-specifieke binding
D	0,30 nM [³ H]-E2+ ER + 0,30 µM E2			0,60 nM [³ H]-E2+ ER + 0,60 µM E2			1,0 nM [³ H]-E2+ ER + 1,0 µM E2			3,0 nM [³ H]-E2+ ER + 3,0 µM E2			
E	0,03 nM [³ H]-E2 (totaal in dpm)			0,06 nM [³ H]-E2			0,08 nM [³ H]-E2			0,10 nM [³ H]-E2			Totaal in dpm (*)
F	0,30 nM [³ H]-E2			0,60 nM [³ H]-E2			1,0 nM [³ H]-E2			3,0 nM [³ H]-E2			

[³H]-E2: [³H]-17β-oestradiol

ER: oestrogenreceptor

E2: ongelabeld 17β-oestradiol

dpm: desintegraties per minuut

(*) De seriële verdunningen van [³H]-gelabeld ('heet') oestradiol hier moeten direct worden toegevoegd aan 200 µl scintillatievloeistof in de putjes G1 - H12.

23. Er moet ten minste 2 uur worden gewacht, alvorens met meten wordt begonnen, en de teltijd moet 40 minuten per putje bedragen. Het aantal desintegraties per minuut per putje (dpm/putje) wordt bepaald met behulp van een scintillatieteller voor microtiterplaten met dovingscorrectie. Als er geen scintillatieteller voor microtiterplaten beschikbaar is, kunnen de monsters ook met een conventionele teller worden gemeten. In dat geval moet worden overwogen de meettijd te verkorten.

Bepaling van de competitieve binding

24. Bij de bepaling van de competitieve binding wordt de binding van één concentratie [³H]-17β-oestradiol in aanwezigheid van oplopende concentraties van de teststof gemeten. Binnen een testrun moeten er voor elke concentratie drie gelijktijdige dublobepalingen worden toegepast. Bovendien moeten er voor elke geteste chemische stof drie niet-gelijktijdige testruns worden uitgevoerd. Voor de bepaling moeten een of meer microtiterplaten met 96 putjes worden gebruikt.

Controles

25. Bij de uitvoering van de bepaling moeten in elk experiment gelijktijdig het oplosmiddel en controles (d.w.z. referentie-oestrogen, zwakke binder en niet-binder) worden opgenomen. Tijdens elke testrun moeten volledige concentratiecurven voor het referentie-oestrogen en de controles (d.w.z. zwakke binder en niet-binder) in één plaat worden gebruikt. Alle andere platen moeten i) een hoge (maximale verdrijving) en een middelhoge (bij benadering de IC₅₀) concentratie van zowel E2 als de zwakke binder in drievoud bevatten, en ii) oplosmiddelcontrole en niet-specifieke binding, elk ten minste in drievoud. De procedures voor de bereiding van de testbuffer, controles en [³H]-17β-oestradiol-, hrERα- en teststofoplossingen worden beschreven in referentie 2 (bijlage K, zie protocol FW-bepaling).

Oplosmiddelcontrole:

26. De oplosmiddelcontrole bevestigt dat er geen interactie optreedt tussen het oplosmiddel en het testsysteem en meet bovendien de totale binding (TB). Als oplosmiddel wordt bij voorkeur ethanol gebruikt. Als de hoogste concentratie teststof niet in ethanol oplosbaar is, mag ook DMSO worden gebruikt. De concentratie ethanol of DMSO, indien gebruikt, is in de putjes aan het eind van de bepaling 1,5 % en mag niet hoger zijn dan 2 %.

Buffercontrole:

27. De buffercontrole (BC) mag geen oplosmiddel of teststof bevatten, maar wel alle andere componenten van de bepaling. De resultaten van de buffercontrole worden vergeleken met de oplosmiddelcontrole om te verifiëren dat het oplosmiddel het testsysteem niet beïnvloedt.

Sterke binder (referentie-oestrogeen)

28. 17 β -oestradiol (CAS 50-28-2) is de endogene ligand en bindt met hoge affiniteit aan de oestrogeenreceptor, alfa-subtype. Voor elke bepaling van de competitieve binding aan de hrER α moet een standaardcurve worden gemaakt met behulp van ongelabeld 17 β -oestradiol, om de variabiliteit bij gebruik van de bepaling in de loop van de tijd in hetzelfde laboratorium te kunnen beoordelen. Er moeten acht oplossingen van ongelabeld 17 β -oestradiol in ethanol worden bereid, waarbij de concentraties in de testputjes afnemen van 100 nM tot 10 pM (-7[logM] tot -11[logM]), met de volgende verdeling: (-7[logM], -8[logM], -8,5[logM], -9[logM], -9,5[logM], -10[logM], -11[logM]). De hoogste concentratie ongelabeld 17 β -oestradiol (1 μ M) dient ook als indicator voor niet-specifieke binding. Deze concentratie wordt in tabel 4 aangeduid met het label NSB, maar is ook onderdeel van de standaardcurve.

Zwakke binder

29. In de test moet een zwakke binder (noretynodrel (CAS RN 68-23-5) of norethisteron (CAS RN 68-22-4)) worden opgenomen om van elk experiment de gevoeligheid aan te tonen en om de variabiliteit te kunnen beoordelen bij gebruik van de bepaling in de loop van de tijd. Er moeten acht oplossingen van de zwakke binder in ethanol worden bereid, waarbij de concentraties in de testputjes oplopen van 3 nM tot 30 μ M (-8,5[logM] tot -4,5[logM]), met de volgende verdeling: (-4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6,5[logM], -7[logM], -7,5[logM], -8,5[logM]).

Niet-binder

30. Als negatieve controle (niet-binder) moet octyltriëthoxysilaan (OTES, CAS RN 2943-75-1) worden gebruikt. Hiermee wordt geverifieerd of de bepaling, zoals ze wordt uitgevoerd, teststoffen wel detecteert als ze niet aan de hrER α binden. Er moeten acht oplossingen van de niet-binder in ethanol worden bereid, waarbij de concentraties in de testputjes in logaritmische stappen oplopen van 0,1 nM tot 1 000 μ M (-10[logM] tot -3[logM]). Als alternatief kan ook di-*n*-butylftalaat (DBP) als niet-binder worden gebruikt. De maximale oplosbaarheid daarvan is vastgesteld op -4[logM].

hrER α -concentratie

31. Voor de bepaling wordt de hoeveelheid receptoren gebruikt waarmee een specifieke binding van 20 \pm 5 % aan 1 nM radioligand wordt verkregen (zie de punten 12-13 van aanhangsel 2). De hrER α -oplossing moet vlak voor gebruik worden bereid.

[³H]-17 β -oestradiol

32. De concentratie [³H]-17 β -oestradiol in de testputjes moet 1,0 nM bedragen.

Teststoffen

33. Vooraf moet voor elke stof een oplosbaarheidstest worden verricht om de oplosbaarheidsgrens vast te stellen en om het passende concentratiebereik te bepalen dat bij de uitvoering van het testprotocol moet worden aangehouden. De oplosbaarheidsgrens van elke teststof wordt eerst bepaald in het oplosmiddel en nader bevestigd onder de omstandigheden van de bepaling. De uiteindelijk in de bepaling te testen concentratie mag niet hoger zijn dan 1 mM. De bereikbepalingstest bestaat uit een oplosmiddelcontrole samen met een logaritmische reeks van acht verdunningen, beginnend bij de maximaal aanvaardbare concentratie (bv. 1 mM of lager, afhankelijk van de oplosbaarheidsgrens), waarbij de aanwezigheid van troebelheid of neerslag moet worden opgemerkt (zie ook punt 35). De teststof moet worden getest met de acht curven van de logaritmische reeks van concentraties uit de voorafgaande bereikbepalingstest. In het tweede en het derde experiment moeten de concentraties voor zover nodig worden aangepast om de concentratie-responscurve beter te kunnen karakteriseren.

34. De verdunningen van de teststof moeten worden bereid in het geschikte oplosmiddel (zie punt 26 van aanhangsel 2). Als de hoogste concentratie van de teststof niet oplosbaar is in ethanol of DMSO en de toevoeging van meer oplosmiddel ertoe zou leiden dat de oplosmiddelconcentratie in het putje aan het eind van de bepaling boven de maximaal aanvaardbare concentratie komt, mag de op een na hoogste concentratie als hoogste concentratie worden genomen. In dat geval kan aan de onderkant van de concentratiereeks een aanvullende concentratie worden toegevoegd. De andere concentraties in de reeks moeten onveranderd blijven.

35. Als de teststofoplossingen aan de testputjes worden toegevoegd, moet goed worden opgelet of er geen neerslag ontstaat. Bij het fitten van de curven moeten de gegevens voor alle putjes met neerslag worden uitgesloten en moet de reden voor deze uitsluiting worden vermeld.
36. Als er gegevens uit andere bronnen voorhanden zijn waaraan een $\log(\text{IC}_{50})$ van een teststof kan worden ontleend, kan het zinvol zijn om de verdunningen geometrisch rond die waarde te spreiden, bv. met 0,5 logeenheden rond de verwachte $\log(\text{IC}_{50})$. De uiteindelijke resultaten moeten een concentratiebereik aan weerszijden van $\log(\text{IC}_{50})$ omvatten, inclusief de top en de basis, dat breed genoeg is om de bindingscurve naar behoren te kunnen karakteriseren.

Testplaatindeling

37. Er moeten gemarkeerde microtiterplaten worden voorbereid voor zes van codes voorziene incubatieduplo's voor de oplosmiddelcontrole, de hoogste concentratie van het referentie-oestrogeen, die ook als indicator voor niet-specifieke binding (NSB) dient, en de buffercontrole en voor drie van codes voorziene incubatieduplo's voor alle acht concentraties van de niet-bindende controle (octyltriëthoxysilaan), de zeven lagere concentraties van het referentie-oestrogeen, de acht concentraties/dosisniveaus van de zwakke binder en de acht concentraties van elke teststof (test chemical, TC) In tabel 4 wordt een voorbeeld gegeven van een plaatindielingsdiagram voor de volledige concentratiecurven van het referentie-oestrogeen en de controles. Voor de teststoffen worden aanvullende microtiterplaten gebruikt. Deze moeten ook de volgende plaatcontroles bevatten: 1) een hoge (maximale verdrijving) en een middel-hoge (bij benadering de IC_{50}) concentratie van zowel E2 als de zwakke binder in drievoud; 2) oplosmiddelcontrole en niet-specifieke binding, elk in zesvoud (tabel 5). In aanhangsel 2.3 is een voorbeeld opgenomen van een werkblad met de microtiterplaatindeling voor een competitieve bepaling met drie onbekende teststoffen. De in de tabellen 4 en 5 aangegeven concentraties zijn de eindconcentraties van de bepaling. De maximale concentratie E2 moet 1×10^{-7} M bedragen en voor de zwakke binder moet de hoogste concentratie van de zwakke binder in plaat 1 worden gebruikt. De IC_{50} -concentratie moet door het laboratorium worden bepaald op basis van zijn historische controledatabank. Naar verwachting zal deze waarde ongeveer gelijk zijn aan de waarde die in de valideringsstudies werd waargenomen (zie tabel 1).

Tabel 4

Microtiterplaatindeling voor de bepaling van de competitieve binding, volledige concentratiecurven voor het referentie-oestrogeen en de controles (plaat 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (alleen oplosmiddel)			TB (alleen oplosmiddel)			NSB			NSB		
B	$\text{E2 } (1 \times 10^{-7})$			$\text{E2 } (1 \times 10^{-8})$			$\text{E2 } (1 \times 10^{-8,5})$			$\text{E2 } (1 \times 10^{-9})$		
C	$\text{E2 } (1 \times 10^{-9,5})$			$\text{E2 } (1 \times 10^{-10})$			$\text{E2 } (1 \times 10^{-11})$			Blanco (*)		
D	$\text{NE } (1 \times 10^{-4,5})$			$\text{NE } (1 \times 10^{-5})$			$\text{NE } (1 \times 10^{-5,5})$			$\text{NE } (1 \times 10^{-6})$		
E	$\text{NE } (1 \times 10^{-6,5})$			$\text{NE } (1 \times 10^{-7})$			$\text{NE } (1 \times 10^{-7,5})$			$\text{NE } (1 \times 10^{-8,5})$		
F	$\text{OTES } (1 \times 10^{-3})$			$\text{OTES } (1 \times 10^{-4})$			$\text{OTES } (1 \times 10^{-5})$			$\text{OTES } (1 \times 10^{-6})$		
G	$\text{OTES } (1 \times 10^{-7})$			$\text{OTES } (1 \times 10^{-8})$			$\text{OTES } (1 \times 10^{-9})$			$\text{OTES } (1 \times 10^{-10})$		
H	Blanco (voor 'heet') (**)			Blanco (voor 'heet') (**)			Buffercontrole			Buffercontrole		

In dit voorbeeld is de zwakke binder noretynodrel (NE)

(*) een echte blanco, putje wordt niet gebruikt

(**) blanco wordt niet gebruikt tijdens de incubatie, maar wel ter bevestiging van de totaal toegevoegde radioactiviteit.

Tabel 5

Microtiterplaatindeling voor de bepaling van de competitieve binding, volledige concentratiecurven voor de teststoffen en plaatcontroles

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (alleen oplosmiddel)			TB (alleen oplosmiddel)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
C	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
D	TC2 (1×10^{-3})			TC2 (1×10^{-4})			TC2 (1×10^{-5})			TC2 (1×10^{-6})		
E	TC2 (1×10^{-7})			TC2 (1×10^{-8})			TC2 (1×10^{-9})			TC2 (1×10^{-10})		
F	TC3 (1×10^{-3})			TC3 (1×10^{-4})			TC3 (1×10^{-5})			TC3 (1×10^{-6})		
G	TC3 (1×10^{-7})			TC3 (1×10^{-8})			TC3 (1×10^{-9})			TC3 (1×10^{-10})		
H	NE (IC ₅₀)			NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			E2 (IC ₅₀)			E2 (1×10^{-7})		

In dit voorbeeld is de zwakke binder noretynodrel (NE)

Afronding van de bepaling van de competitieve binding

38. Zoals in tabel 6 weergegeven moet er 80 µl van de oplosmiddelcontrole, de buffercontrole, het referentie-oestrogeen, de zwakke binder, de niet-binder en de in testbuffer bereide teststoffen aan de putjes worden toegevoegd. Vervolgens wordt er aan elk putje 40 µl van een 4 nM [³H]-17β-oestradioloplossing toegevoegd. Na 10 à 15 minuten voorzichtig roteren bij een temperatuur van 2 tot 8 °C wordt er 40 µl hrERα-oplossing toegevoegd. De testplaten moeten 16 tot 20 uur worden geïncubeerd bij 2 tot 8 °C en moeten gedurende de incubatieperiode op een schudder worden geplaatst.

Tabel 6

Het volume van de testcomponenten voor de bepaling van de competitieve binding aan de hrER, microtiterplaten

Volume (µl)	Bestanddeel
80	Ongelabeld 17β-oestradiol, noretynodrel, OTES, teststoffen, oplosmiddel of buffer
40	4 nM [³ H]-17β-oestradioloplossing
40	hrERα-oplossing, in de vooraf bepaalde concentratie
160	Totaal volume in elk testputje

39. Nadat het aan de hrERα gebonden [³H]-17β-oestradiol door de toevoeging aan elk putje van 80 µl koude DCC-suspensie is gescheiden van het vrije [³H]-17β-oestradiol, moet het aan de hrERα gebonden [³H]-17β-oestradiol worden gekwantificeerd zoals beschreven in de punten 20-23 voor de bepaling van de verzadigingsbepaling.
40. De putjes H1-6 (in tabel 4 aangeduid als blanco's (voor 'heet')) vertegenwoordigen de desintegraties per minuut (dpm) van het [³H]-oestradiol in 40 µl. Het aliquot van 40 µl moet in de putjes H1 - H6 direct aan de scintillatievloeistof worden toegevoegd.

Aanvaardbaarheidscriteria

Bepaling van de verzadigingsbinding

41. Naarmate de gebruikte concentratie [^3H]-17 β -oestradiol oploopt, moet de curve voor de specifieke binding een plateau bereiken, waaruit blijkt dat de hrER α verzadigd raakt met ligand.
42. De specifieke binding bij 1 nM [^3H]-17 β -oestradiol moet binnen het aanvaardbare bereik van 15 % tot 25 % van het gemiddelde van de in totaal gemeten radioactiviteit over alle testruns blijven. Incidentele, lichte afwijkingen buiten dit bereik zijn aanvaardbaar, maar als testruns structureel buiten dit bereik uitkomen of als voor een bepaalde testrun de specifieke binding ver erbuiten ligt, moet de eiwitconcentratie worden aangepast en moet de bepaling van de verzadigingsbinding worden herhaald.
43. De gegevens moeten een lineaire Scatchard-plot opleveren.
44. Er mag niet te veel niet-specifieke binding optreden. In het algemeen moet de waarde voor de niet-specifieke binding < 35 % van de totale binding zijn. Incidenteel mag de verhouding deze grens evenwel overschrijden bij het meten van zeer lage aantallen dpm voor de laagst geteste concentratie radioactief gelabeld 17 β -oestradiol.

Bepaling van de competitieve binding

45. Naarmate de concentratie ongelabeld 17 β -oestradiol oploopt, moet het [^3H]-17 β -oestradiol van de receptor verdrijven op een manier die past bij competitieve binding op één bindingsplaats.
46. De IC₅₀-waarde voor het referentie-oestrogeen (d.w.z. 17 β -oestradiol) moet ongeveer gelijk zijn aan de molaire concentratie [^3H]-17 β -oestradiol plus de K_d zoals bepaald in de bepaling van de verzadigingsbinding.
47. De totale specifieke binding moet steeds binnen het aanvaardbare bereik van 20 \pm 5 % blijven, wanneer het gemiddelde van de gemeten concentratie van de totale radioactiviteit die aan elk putje is toegevoegd, voor alle testruns 1 nM is. Incidentele, lichte afwijkingen buiten dit bereik zijn aanvaardbaar, maar als testruns structureel buiten dit bereik uitkomen of als voor een bepaalde testrun de specifieke binding ver erbuiten ligt, moet de eiwitconcentratie worden aangepast.
48. Het oplosmiddel mag geen invloed hebben op de gevoeligheid en reproduceerbaarheid van de bepaling. De resultaten van de oplosmiddelcontrole (TB-putjes) worden vergeleken met de buffercontrole om te verifiëren dat het oplosmiddel het testsysteem niet beïnvloedt. Als het oplosmiddel geen invloed heeft op de bepaling, moeten de resultaten van de oplosmiddel- en de buffercontrole vergelijkbaar zijn.
49. De niet-binder mag niet meer dan 25 % van het [^3H]-17 β -oestradiol van de hrER α verdrijven, wanneer wordt getest tot 10⁻³ M (OTES) of 10⁻⁴ M (DBP).
50. De prestatiecriteria voor het referentie-oestrogeen en de twee zwakke binders (bv. noretynodrel of norethisteron) zijn tot stand gekomen op basis van gegevens uit de valideringsstudie van de FW-hrER-bindingsbepaling (bijlage N van referentie 2). De 95 %-betrouwbaarheidsintervallen komen voort uit de gemiddelden (\bar{n}) \pm SD van alle controletestruns in alle laboratoria die aan de valideringsstudie hebben deelgenomen. Er zijn 95 %-betrouwbaarheidsintervallen berekend voor de curvefittingsparameters (d.w.z. top, basis, Hill-coëfficiënt, log(IC₅₀)) van het referentie-oestrogeen en de zwakke binders en voor de log₁₀RBA van de zwakke binders ten opzichte van het referentie-oestrogeen. Deze worden gegeven als prestatiecriteria voor de positieve controles. In tabel 1 zijn de verwachte bereiken voor de curvefittingsparameters weergegeven, die als prestatiecriteria kunnen worden gebruikt. In de praktijk kan het bereik van de IC₅₀ licht variëren afhankelijk van de K_d van het receptorpreparaat en de ligandconcentratie.

51. Voor de curvefittingsparameters voor de teststoffen zijn geen prestatiecriteria opgesteld vanwege het brede spectrum aan bestaande potentiële teststoffen en de varia in potentiële affiniteiten en uitslagen (bv. volledig gefitte, gedeeltelijk gefitte of geen gefitte curve). De resultaten van elke testrun voor een teststof moeten evenwel worden geëvalueerd op basis van professioneel oordeel. Er moet een voldoende breed bereik van concentraties van de teststof worden gebruikt om de top van de competitieve curve (bv. 90-100 % binding) duidelijk te kunnen bepalen. De variabiliteit tussen de duplo's van elke teststofconcentratie en tussen de drie gelijktijdige testruns moet binnen redelijke grenzen blijven en wetenschappelijk verdedigbaar zijn. De controles van elke testrun voor een teststof moeten de voor deze FW-bepaling gerapporteerde prestatiemetingen benaderen en consistent zijn met de historische controlegegevens van elk betreffende laboratorium.

ANALYSE VAN DE GEGEVENS

Bepaling van de verzadigingsbinding

52. Zowel de totale als de niet-specifieke binding wordt gemeten. Op basis van deze waarden wordt de specifieke binding van oplopende concentraties [³H]-17β-oestradiol in evenwichtstoestand berekend door de niet-specifieke binding van de totale binding af te trekken. Wanneer de specifieke binding wordt uitgezet tegen de concentratie [³H]-17β-oestradiol moet de grafiek een plateau bereiken voor de maximale specifieke binding, die overeenkomt met de verzadiging van de hrERα met het [³H]-17β-oestradiol. Bovendien moet een analyse van de gegevens blijken geven van de binding van het [³H]-17β-oestradiol aan één bindingsplaats met een hoge affiniteit. De curve voor de verzadigingsbinding moet de niet-specifieke, totale en specifieke binding weergeven. Voor de verdere analyse van deze gegevens moet een niet-lineaire regressieanalyse worden gebruikt (bv. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995), waarna de gegevens worden gepresenteerd in de vorm van een Scatchard-plot.
53. Bij de analyse van de gegevens moeten B_{\max} en K_d worden bepaald op basis van alleen de gegevens voor de totale binding, waarbij wordt aangenomen dat de niet-specifieke binding lineair is, tenzij het gebruik van een andere methode wordt onderbouwd. Bovendien moet voor het bepalen van de beste fit robuuste regressie worden toegepast, tenzij een rechtvaardiging wordt gegeven voor een afwijkende keuze. De robuuste-regressiemethode moet worden vermeld. Bij het bepalen van B_{\max} en K_d uit gegevens voor de verzadigingsbinding moet altijd worden gecorrigeerd voor liganddepletie (bv. met behulp van de methode van Swillens, 1995).

Bepaling van de competitieve binding

54. De competitievebindingscurve wordt uitgezet als de specifieke binding van [³H]-17β-oestradiol tegen de concentratie (log₁₀-eenheden) van de competitor. De concentratie waarbij de teststof de maximale specifieke binding van [³H]-17β-oestradiol voor 50 % remt, is de IC₅₀-waarde.
55. De log(IC₅₀)-waarden voor de positieve controles (bv. het referentie-oestrogeen en de zwakke binder) moeten worden geschat met behulp van software voor niet-lineaire fitting van de curve die geschikt is voor het fitten van een Hill-vergelijking met vier parameters (bv. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Bij het fitten van de curven moeten de top, basis, Hill-coëfficiënt, en log(IC₅₀) over het algemeen onbegrensd blijven. Voor het bepalen van de beste fit moet robuuste regressie worden toegepast, tenzij een rechtvaardiging wordt gegeven voor een afwijkende keuze. Er moet niet worden gecorrigeerd voor liganddepletie. Na de eerste analyse moet voor elke bindingscurve worden geverifieerd op een goede fit ten opzichte van het model. De relatieve bindingsaffiniteit (RBA) voor de zwakke binder moet worden berekend als een percentage van de log(IC₅₀) voor de zwakke binder ten opzichte van de log(IC₅₀) voor 17β-oestradiol. De resultaten van de positieve controles en de controle met de niet-binder moeten worden beoordeeld aan de hand van de maatstaven voor de prestaties van de bepaling in de punten 45-50 van aanhangsel 2.
56. De gegevens voor alle teststoffen moeten worden geanalyseerd volgens een trapsgewijze benadering, zodat de gegevens correct worden beoordeeld en elke competitievebindingscurve correct wordt ingedeeld. Aanbevolen wordt om elke testrun voor een teststof eerst te onderwerpen aan een gestandaardiseerde gegevensanalyse die identiek is aan de gegevensanalyse die werd gebruikt voor het referentie-oestrogeen en de zwakkebindercontroles (zie punt 55 hierboven). Zodra deze is afgerond, moet een technische beoordeling van de curvefittingsparameters worden verricht, alsmede een visuele inspectie van de mate waarin de gegevens overeenkomen met de gegenereerde competitieve-bindingscurve voor elke testrun. Bij deze technische beoordeling zijn een waargenomen concentratie-afhankelijke afname van het percentage specifiek gebonden [³H]-17β-oestradiol, een geringe variabiliteit tussen de technische duplo's van elke teststofconcentratie en de consistentie in de fittingsparameters tussen de drie testruns een goede indicatie dat de bepaling en de gegevensanalyses correct zijn uitgevoerd.

Gegevensinterpretatie

- 57. Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt een teststof als binder voor de hrERa beschouwd als er een bindingscurve kan worden gefit en het laagste punt op de responscurve binnen het bereik van de gegevens overeenkomt met minder dan 50 % binding (figuur 1).
- 58. Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt een teststof als niet-binder voor de hrERa beschouwd als:
 - er een bindingscurve gefit kan worden en het laagste punt op de gefitte responscurve binnen het bereik van de gegevens overeenkomt met meer dan 75 % binding, of
 - er geen bindingscurve kan worden gefit en het laagste, niet-afgevlakte gemiddelde bindingspercentage van alle concentratiegroepen binnen de gegevens overeenkomt met meer dan 75 % binding.
- 59. Als aan geen van de bovenstaande voorwaarden wordt voldaan (bv. als het laagste punt op de gefitte responscurve overeenkomt met 76 tot 51 % binding) wordt de teststof als 'onduidelijk' beschouwd.

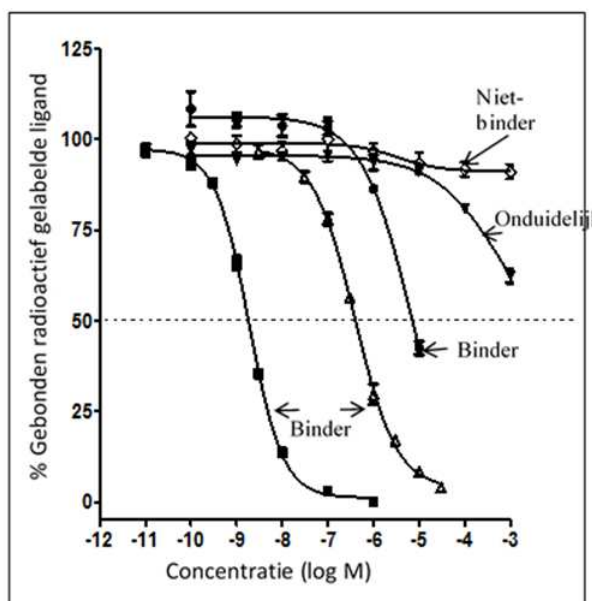
Tabel 7

Criteria voor de indeling van een teststof op basis van de competitiebindingscurve

Indeling	Criterium
Binder ^a	Er kan een curve worden gefit. Het laagste punt op de responscurve binnen het bereik van de gegevens komt overeen met minder dan 50 % binding.
Niet-binder ^b	Als er een curve kan worden gefit, komt het laagste punt op de gefitte responscurve binnen het bereik van de gegevens overeen met meer dan 75 % binding. Als er geen curve kan worden gefit, komt het laagste, niet-afgevlakte gemiddelde bindingspercentage van alle concentratiegroepen binnen de gegevens overeen met meer dan 75 % binding.
Onduidelijk ^c	Een beoordeelbare testrun die noch als binder, noch als niet-binder kan worden ingedeeld (bv. het laagste punt op de gefitte responscurve komt overeen met 76 tot 51 % binding).

Figuur 1

Voorbeelden van de indeling van een teststof met behulp van een competitiebindingscurve



60. De verschillende testruns die binnen een laboratorium voor een teststof zijn uitgevoerd, worden gecombineerd door aan elke testrun numerieke waarden toe te kennen en het gemiddelde van deze waarden te nemen, zoals weergegeven in tabel 8. De resultaten van de gecombineerde testruns binnen elk laboratorium worden vergeleken met de verwachte indeling voor elke teststof.

Tabel 8

Methode voor de indeling van een teststof op basis van meerdere testruns binnen hetzelfde laboratorium

Toekenning van een waarde aan elke testrun:	
Indeling	Numerieke waarde
Binder	2
Onduidelijk	1
Niet-binder	0
Indeling op basis van het gemiddelde van de numerieke waarden van de testruns:	
Indeling	Numerieke waarde
Binder	Gemiddelde $\geq 1,5$
Onduidelijk	$0,5 \leq \text{Gemiddelde} < 1,5$
Niet-binder	Gemiddelde $< 0,5$

TESTVERSLAG

61. Zie punt 24 van **COMPONENTEN VAN DE hrER-BINDINGSBEPALING** van deze testmethode.

Aanhangsel 2.1

TERMENLIJST

[³H]E2: met radioactief tritium gelabeld 17 β -oestradiol.

DCC: met dextraan beklede kool.

Duplo: een van de meerdere putjes in één testrun die dezelfde inhoud in dezelfde concentraties bevatten en die gelijktijdig worden getest. In dit protocol wordt elke concentratie van de teststof in drievoud getest; dat wil zeggen bij elke concentratie van de teststof worden er drie duplo's gelijktijdig getest.

E2: ongelabeld 17 β -oestradiol (inert).

hrER α : menselijke recombinante oestrogenreceptor alfa.

Testbuffer: 10 mM tris, 10 mg runderserumalbumine/ml, 2 mM DTT, 10 % glycerol, 0,2 mM leupeptine, pH 7,5.

Testrun: een volledige set van gelijktijdig gerunde testputjes van een microtiterplaat die alle benodigde gegevens oplevert voor het bepalen van de binding van een teststof aan de hrER α , namelijk de totale hoeveelheid aan het testputje toegevoegd [³H]-17 β -oestradiol, de maximale binding van [³H]-17 β -oestradiol aan de hrER α , de niet-specifieke binding en de totale binding bij verschillende teststofconcentraties). Een testrun zou uit slechts één testputje per concentratie kunnen bestaan, maar aangezien dit protocol testen in drievoud voorschrijft, bestaat een testrun uit drie testputjes per concentratie. Bovendien schrijft dit protocol drie onafhankelijke (d.w.z. niet-gelijktijdige) testruns per chemische stof voor.

Aanhangsel 2.2

VOORBEELD VAN EEN BEPALING VAN DE VERZADIGING MET [³H]-17B-OESTRADIOL IN DRIEVOLD

Voorbeeld van een bepaling van de verzadiging met [³ H]-17β-oestradiol in drievoud											
Positie	Duplo	Code voor type putje	Beginconcentratie 'heet' E2 (nM)	Volume 'heet' E2 (μl)	Eindconcentratie 'heet' E2 (nM)	Beginconcentratie 'koud' E2 (μM)	Volume 'koud' E2 (μl)	Eindconcentratie 'koud' E2 (μM)	Volume buffer (μl)	Volume receptor (μl)	Totaal volume in putjes
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160

Voorbeeld van een bepaling van de verzadiging met [³H]-17β-oestradiol in drievoud

Positie	Duplo	Code voor type pufje	Beginconcentratie 'heet' E2 (nM)	Volume 'heet' E2 (µl)	Eindconcentratie 'heet' E2 (nM)	Beginconcentratie 'koud' E2 (µM)	Volume 'koud' E2 (µl)	Eindconcentratie 'koud' E2 (µM)	Volume buffer (µl)	Volume receptor (µl)	Totaal volume in pufjes
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160

Voorbeeld van een bepaling van de verzadiging met [³H]-17β-oestradiol in drievoud

Positie	Duplo	Code voor type pufje	Beginconcentratie 'heet' E2 (nM)	Volume 'heet' E2 (µl)	Eindconcentratie 'heet' E2 (nM)	Beginconcentratie 'koud' E2 (µM)	Volume 'koud' E2 (µl)	Eindconcentratie 'koud' E2 (µM)	Volume buffer (µl)	Volume receptor (µl)	Totaal volume in pufjes
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Heet	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Heet	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Heet	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Heet	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Heet	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Heet	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Heet	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Heet	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Heet	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Heet	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Heet	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Heet	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Heet	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Heet	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Heet	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Heet	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40

Voorbeeld van een bepaling van de verzadiging met [³H]-17β-oestradiol in drievoud

Positie	Duplo	Code voor type putje	Beginconcentratie 'heet' E2 (nM)	Volume 'heet' E2 (µl)	Eindconcentratie 'heet' E2 (nM)	Beginconcentratie 'koud' E2 (µM)	Volume 'koud' E2 (µl)	Eindconcentratie 'koud' E2 (µM)	Volume buffer (µl)	Volume receptor (µl)	Totaal volume in putjes
H5	2	Heet	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Heet	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Heet	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Heet	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Heet	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Heet	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Heet	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Heet	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Er zij op gewezen dat de 'hot' (heet) putjes tijdens de incubatie leeg zijn. De 40 µl wordt alleen toegevoegd voor de scintillatietelling.

Aanhangsel 2.3:

PLAATINDELING VOOR DE BEPALING VAN DE COMPETITIEVE BINDING

Plaat	Positie	Duplo	Type putje	Code putje	Code concentratie	Beginconcentratie competitor (M)	IrER-stamoplossing (µl)	Volume buffer (µl)	Volume tracer („hete” E2) (µl)	Volume verdunningsplaat (µl)	Eindvolume (µl)	Eindconcentratie competitor (M)
S	A1	1	totale binding	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
S	A2	2	totale binding	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
S	A3	3	totale binding	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
S	A4	1	totale binding	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
S	A5	2	totale binding	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
S	A6	3	totale binding	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
S	A7	1	„koud” E2 (hoog)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	„koud” E2 (hoog)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	„koud” E2 (hoog)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	„koud” E2 (hoog)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	„koud” E2 (hoog)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	„koud” E2 (hoog)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	„koud” E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	„koud” E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	„koud” E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	„koud” E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B5	2	„koud” E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	„koud” E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	„koud” E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	„koud” E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	„koud” E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09

Plaat	Positie	Duplo	Type pufje	Code pufje	Code concentratie	Beginconcentratie competitor (M)	hrER-stamoplossing (µl)	Volume buffer (µl)	Volume tracer („hete” E2) (µl)	Volume verdunningsplaat (µl)	Eindvolume (µl)	Eindconcentratie competitor (M)
S	B10	1	„koud” E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	„koud” E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	„koud” E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	„koud” E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	„koud” E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	„koud” E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	„koud” E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	„koud” E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	„koud” E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	„koud” E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	„koud” E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C9	3	„koud” E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	blanco	blanco	B1	—	—	160	—	—	160	—
S	C11	2	blanco	blanco	B2	—	—	160	—	—	160	—
S	C12	3	blanco	blanco	B3	—	—	160	—	—	160	—
S	D1	1	noretynodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	noretynodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	noretynodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	noretynodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	noretynodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	noretynodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05

Plaats	Positie	Duplo	Type pufje	Code pufje	Code concentratie	Beginconcentratie competitor (M)	hrER-stamoplossing (µl)	Volume buffer (µl)	Volume tracer („hete” E2) (µl)	Volume verdunningsplaat (µl)	Eindvolume (µl)	Eindconcentratie competitor (M)
S	D7	1	noretynodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	noretynodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	noretynodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	noretynodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	noretynodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	noretynodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	E1	1	noretynodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	noretynodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	noretynodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	noretynodrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	noretynodrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	noretynodrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	noretynodrel	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E8	2	noretynodrel	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	noretynodrel	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	noretynodrel	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09

Plaat	Positie	Duplo	Type pufje	Code pufje	Code concentratie	Beginconcentratie competitor (M)	hrER-stamoplossing (µl)	Volume buffer (µl)	Volume tracer („hete” E2) (µl)	Volume verdunningsplaat (µl)	Eindvolume (µl)	Eindconcentratie competitor (M)
S	E11	2	noretynodrel	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	noretynodrel	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G6	3	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09

Plaat	Positie	Duplo	Type putje	Code putje	Code concentratie	Beginconcentratie competitor (M)	hrER-stamoplossing (µl)	Volume buffer (µl)	Volume tracer („hete” EZ) (µl)	Volume verdunningsplaat (µl)	Eindvolume (µl)	Eindconcentratie competitor (M)
S	G8	2	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	H1	1	heet	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H2	1	heet	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H3	1	heet	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H4	1	heet	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H5	1	heet	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H6	1	heet	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H7	1	buffercontrole	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H8	1	buffercontrole	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H9	1	buffercontrole	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H10	1	buffercontrole	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H11	1	buffercontrole	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H12	1	buffercontrole	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—

Er zij op gewezen dat de „hot” (heet) putjes tijdens de incubatie leeg zijn. De 40 µl wordt alleen toegevoegd voor de scintillatietelling.

Plaatindeling voor de bepaling van de competitieve binding

Plaat	Positie	Duplo	Type pufje	Code pufje	Code concentratie	Beginconcentratie competitor (M)	hrER-stamoplossing (µl)	Volume buffer (µl)	Volume tracer („hete” E2) (µl)	Volume verdunningsplaat (µl)	Eindvolume (µl)	Eindconcentratie competitor (M)
P1	A1	1	totale binding	TB	TBB1B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	totale binding	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	totale binding	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	totale binding	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	totale binding	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	totale binding	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	„koud” E2 (hoog)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	„koud” E2 (hoog)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	„koud” E2 (hoog)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	„koud” E2 (hoog)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	„koud” E2 (hoog)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A12	3	„koud” E2 (hoog)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	Teststof 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	Teststof 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	Teststof 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	Teststof 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	Teststof 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	Teststof 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	Teststof 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	Teststof 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	Teststof 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	Teststof 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	Teststof 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	Teststof 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Plaatindeling voor de bepaling van de competitieve binding

Plaat	Positie	Duplo	Type putje	Code putje	Code concentratie	Beginconcentratie competitor (M)	InER-stamoplossing (µl)	Volume buffer (µl)	Volume tracer („hete“ E2) (µl)	Volume verdunningsplaat (µl)	Eindvolume (µl)	Eindconcentratie competitor (M)
P1	C1	1	Teststof 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	Teststof 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	Teststof 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	Teststof 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	Teststof 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	Teststof 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	Teststof 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	Teststof 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	Teststof 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	Teststof 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	Teststof 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	Teststof 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	Teststof 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	Teststof 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	Teststof 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	Teststof 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	Teststof 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	Teststof 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	Teststof 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	Teststof 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	Teststof 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	Teststof 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	Teststof 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	Teststof 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Plaatindeling voor de bepaling van de competitieve binding

Plaat	Positie	Duplo	Type putje	Code putje	Code concentratie	Beginconcentratie competitor (M)	InER-stamoplossing (µl)	Volume buffer (µl)	Volume tracer („hete“ E2) (µl)	Volume verdunningsplaat (µl)	Eindvolume (µl)	Eindconcentratie competitor (M)
P1	E1	1	Teststof 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	Teststof 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	Teststof 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E4	1	Teststof 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	Teststof 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	Teststof 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	Teststof 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	Teststof 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	Teststof 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	Teststof 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	Teststof 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	Teststof 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	Teststof 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	Teststof 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	Teststof 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	Teststof 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	Teststof 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	Teststof 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	Teststof 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	Teststof 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	Teststof 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	Teststof 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	Teststof 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	Teststof 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Plaatindeling voor de bepaling van de competitieve binding

Plaat	Positie	Duplo	Type putje	Code putje	Code concentratie	Beginconcentratie competitor (M)	InER-stamoplossing (µl)	Volume buffer (µl)	Volume tracer („hete” E2) (µl)	Volume verdunningsplaat (µl)	Eindvolume (µl)	Eindconcentratie competitor (M)
P1	G1	1	Teststof 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	Teststof 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	Teststof 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	Teststof 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	Teststof 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	Teststof 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	Teststof 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	Teststof 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	Teststof 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	Teststof 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	Teststof 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	Teststof 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	noretynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretynodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretynodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretynodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	„koud” E2 S			IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	„koud” E2 S			IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	„koud” E2 S			IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	„koud” E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	„koud” E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	„koud” E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	

Aanhangsel 3

DE IN-VITROBEPALING VAN DE BINDING AAN DE OESTROGEENRECEPTOR MET EEN MENSELIJK RECOMBINANT ERA-LIGANDBINDINGSDOMEIN-EIWIT VAN HET JAPANESE CHEMICALS EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE (CERI-BEPALING)

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN (ZIE OOK ALGEMENE INLEIDING)

1. Bij deze in-vitrobepaling van de verzadigingsbinding en competitieve binding aan de oestrogeenreceptor (ER α) wordt gebruikgemaakt van een ligandbindingsdomein (LBD) van de menselijke ER α (hrER α). Dit eiwitpreparaat is geproduceerd door het Japanse Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI), Japan, en bestaat in de vorm van een fusie-eiwit met glutathion-S-transferase (GST), tot expressie gebracht in *E. coli*. Het CERI-protocol is aan een internationale valideringsstudie in meerdere laboratoria (2) onderworpen, die de relevantie en de betrouwbaarheid van het protocol voor het beoogde doel van de bepaling heeft aangetoond.
2. Deze bepaling is een screeningsprocedure voor het identificeren van stoffen die aan de hrER α kunnen binden, en wordt gebruikt voor het bepalen van het vermogen van een teststof om met 17 β -oestradiol te concurreren om binding aan de hrER α -LBD. De kwantitatieve resultaten van de bepaling kunnen onder meer de IC₅₀ (een maat voor de concentratie waarbij een teststof de helft van het [³H]-17 β -oestradiol van de hrER α verdrijft) en de relatieve bindingsaffiniteiten van de teststoffen voor de hrER α ten opzichte van 17 β -oestradiol omvatten. Ten behoeve van de screening van een chemische stof kunnen aanvaardbare kwalitatieve resultaten van de bepaling onder meer bestaan in de indeling van teststoffen als hrER α -binders, niet-binders, of onduidelijk op basis van criteria die zijn vastgesteld voor de bindingscurven.
3. Omdat voor de bepaling een radioactief gelabelde ligand wordt gebruikt, heeft het laboratorium een vergunning voor het werken met radioactieve stoffen nodig. Alle procedures met radio-isotopen en gevaarlijke chemische stoffen moeten voldoen aan de regelgeving en procedures zoals beschreven door nationale wetgeving.
4. Alvorens deze bepaling te gebruiken met het oog op regelgeving, moeten de „ALGEMENE INLEIDING” en „**COMPONENTEN VAN DE hrER-BINDINGSBEPALING**” worden geraadpleegd. De in deze TG gebruikte definities en afkortingen staan in aanhangsel 1.

BEGINSELEN VAN DE BEPALING (ZIE OOK DE ALGEMENE INLEIDING)

5. De bindingsbepaling met hrER α meet het vermogen van een radioactief gelabelde ligand ([³H]17 β -oestradiol) om aan de ER te binden in aanwezigheid van oplopende concentraties van een teststof (een „competitor”). Teststoffen met een hoge affiniteit voor de ER concurreren in een lagere concentratie met de radioactief gelabelde ligand dan chemische stoffen met een lagere affiniteit voor de receptor.
6. Deze bepaling heeft twee hoofdcomponenten: een bepaling van de verzadigingsbinding om de parameters van de receptor-ligandinteractie te bepalen, gevolgd door een bepaling van de competitieve binding die de concurrentie tussen een teststof en een radioactief gelabelde ligand om binding aan de ER karakteriseert.
7. De bepaling van de verzadigingsbinding is bedoeld om de bindingsaffiniteit en het aantal receptoren in een bepaalde partij te bepalen, ter voorbereiding van de bepaling van de competitieve binding. Bij de bepaling van de verzadigingsbinding worden in een evenwichtstoestand de affiniteit van een vaste concentratie oestrogeenreceptoren voor hun natuurlijke ligand (uitgedrukt als de dissociatieconstante K_d) en de concentratie actieve receptorplaatsen (B_{max}) gemeten.
8. Bij de bepaling van de competitieve binding wordt de affiniteit van een stof om met [³H]17 β -oestradiol te concurreren om binding aan de ER gemeten. De affiniteit wordt gekwantificeerd door de concentratie waarbij de teststof, in een evenwichtstoestand, 50 % remming van de specifieke binding van [³H]17 β -oestradiol veroorzaakt (de zogenaamde „inhibitory concentration 50 %” of IC₅₀). Ze kan ook worden beoordeeld met behulp van de relatieve bindingsaffiniteit (RBA) ten opzichte van de IC₅₀ van oestradiol, onafhankelijk gemeten in dezelfde testrun. Bij de bepaling van de competitieve binding wordt de binding van [³H]17 β -oestradiol in een vaste concentratie gemeten in aanwezigheid van een breed spectrum (acht orden van grootte) aan teststofconcentraties. De gegevens worden vervolgens, voor zover mogelijk, gefit tot een vorm van de Hill-vergelijking (Hill, 1910) die de verdringing van de radioactief gelabelde ligand door een competitieve binder voor één bindingsplaats beschrijft. De mate van verdringing van radioactief gelabeld oestradiol in evenwicht wordt gebruikt om de teststof te karakteriseren als een binder, een niet-binder of een stof met een onduidelijke respons.

PROCEDURE

Aantoning van aanvaardbare prestaties van het eiwit hrERα

9. Voorafgaand aan de routinematige uitvoering van de bepalingen van de verzadigingsbinding en de competitieve binding moet voor elke nieuwe partij hrERα worden aangetoond dat deze correct presteert in het laboratorium waar de partij zal worden gebruikt. Het proces om de prestaties aan te tonen bestaat uit de volgende twee stappen:

- een bepaling van de verzadigingsbinding met [³H]-17β-oestradiol om de specificiteit en de verzadiging voor hrERα aan te tonen. Met behulp van een niet-lineaire regressieanalyse van deze gegevens (bv. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) en de daaruit afgeleide Scatchard-plot worden de bindingsaffiniteit voor hrERα van [³H]-17β-oestradiol (K_d) en het aantal receptoren (B_{max}) voor een bepaalde partij hrERα gedocumenteerd;
- een bepaling van de competitieve binding met de controlestoffen (het referentie-oestrogeen (17β-oestradiol), een zwakke binder (bv. noretynodrel of norethisteron), en een niet-binder (octyltriëthoxysilaan, OTES). Elk laboratorium moet een historische databank aanleggen om de consistentie van de IC_{50} en de relevante waarden voor het referentie-oestrogeen en de zwakke binder tussen de experimenten en de verschillende partijen hrERα te documenteren. Bovendien moeten de parameters van de competitievebindingscurven voor de controlestoffen binnen de grenzen van het 95 %-betrouwbaarheidsinterval (zie tabel 1) blijven, die werden vastgesteld op basis van gegevens van de laboratoria die aan de valideringsstudie voor deze bepaling hebben deelgenomen (2).

Tabel 1

Prestatiecriteria voor het referentie-oestrogeen en de zwakke binder in de CERi-hrER-bindingbepaling

Stof	Parameter	Gemiddelde ^(a)	Standaarddeviatie (n)	95 %-Betrouwbaarheidsintervallen ^(b)	
				Ondergrens	Bovengrens
17β-Oestradiol	Top	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Basis	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Hill-coëfficiënt	-1,22	0,20 (70)	-1,27	-1,17
	LogIC ₅₀	-8,93	0,23 (70)	-8,98	-8,87
Noretynodrel	Top	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Basis	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hill-coëfficiënt	-1,04	0,21 (68)	-1,09	-0,99
	LogIC ₅₀	-6,19	0,40 (68)	-6,29	-6,10
Norethisteron ^(c)	Top	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Basis	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hill-coëfficiënt	-1,18	0,32 (23)	-1,31	-1,04
	LogIC ₅₀	-6,01	0,54 (23)	-6,25	-5,78

^(a) Gemiddelde waarden ± standaarddeviatie (SD) met steekproefgrootte (n) zijn berekend aan de hand van de geschatte curvefit (Hill-vergelijking met vier parameters) voor de controletestruns die zijn uitgevoerd in vier laboratoria tijdens de valideringsstudie (zie bijlage N van referentie 2).

^(b) Deze 95 %-betrouwbaarheidsintervallen zijn bedoeld ter oriëntatie voor aanvaardbaarheidscriteria.

^(c) In de valideringsstudie was het testen van norethisteron optioneel voor Subtask 4 (zie referentie 2, Subtask 4). De gemiddelde waarden ± SD (n) werden daarom berekend aan de hand van de geschatte curvefittingsparameters (Hill-vergelijking met vier parameters) voor de controletestruns die werden uitgevoerd in twee laboratoria. Het IC_{50} -bereik zal afhangen van de K_d van het receptorpreparaat en de concentratie radioactief ligand die in elk laboratorium worden gebruikt. Het is aanvaardbaar om het IC_{50} -bereik aan te passen op basis van de omstandigheden bij de uitvoering van de bepaling.

Aantoning van de bekwaamheid van laboratoria

10. Zie de punten 17 en 18 en tabel 2 in „**COMPONENTEN VAN DE hrER-BINDINGSBEPALING**” van deze testmethode. Elke bepaling (verzadigingsbinding en competitieve binding) moet bestaan uit drie onafhankelijke testruns (d.w.z. met verse verdunningen van receptor, chemische stoffen en reagentia) op verschillende dagen, en elke testrun moet drie duplo's omvatten.

Bepaling van de concentratie van de receptor (hrER α)

11. De concentratie actieve receptoren varieert enigszins, afhankelijk van de partij en de bewaaromstandigheden. Daarom moet de concentratie actieve receptoren in de door de leverancier geleverde partij worden bepaald. Daarmee wordt de precieze concentratie actieve receptoren op het moment van de testrun verkregen.
12. Onder de omstandigheden van de bepaling van de competitieve binding (d.w.z. 0,5 nM [^3H]-oestradiol) worden nominale concentraties van 0,1, 0,2, 0,4 en 0,6 nM receptor geïncubeerd in afwezigheid (totale binding) en aanwezigheid (niet-specifieke binding) van 1 μM ongelabeld oestradiol. De specifieke binding, berekend als het verschil tussen de totale en de niet-specifieke binding, wordt uitgezet tegen de nominale receptorconcentratie. Uit de receptorconcentratie waarbij de waarden voor de specifieke binding overeenkomen met 40 % van de toegevoegde radioactief gelabelde ligand kan de receptorconcentratie worden afgeleid en deze moet worden gebruikt voor de bepalingen van de verzadigingsbinding en de competitieve binding. Vaak voldoet een hrER-eindconcentratie van 0,2 nM aan deze voorwaarde.
13. Als herhaaldelijk niet aan het 40 %-criterium kan worden voldaan, moet de proefopzet worden gecontroleerd op eventuele fouten. Dat het 40 %-criterium niet wordt gehaald, kan erop wijzen dat er zeer weinig actieve receptor in de recombinante partij aanwezig is. In dat geval moet worden overwogen een andere receptorpartij te gebruiken.

Verzadigingsbepaling

14. Er moeten acht oplopende concentraties [^3H]-17 β -oestradiol in drievoud worden beoordeeld onder de volgende drie omstandigheden (zie tabel 2):
 - a. in afwezigheid van ongelabeld 17 β -oestradiol en in aanwezigheid van ER. Dit is de bepaling van de totale binding door meting van de radioactiviteit in de putjes die alleen [^3H]-17 β -oestradiol bevatten;
 - b. in aanwezigheid van een concentratie ongelabeld 17 β -oestradiol die 2000 maal hoger is dan die van gelabeld 17 β -oestradiol en in aanwezigheid van ER. De bedoeling hiervan is om de actieve bindingssites te verzadigen met ongelabeld 17 β -oestradiol en vervolgens door de radioactiviteit in de putjes te meten, de niet-specifieke binding te bepalen. Van al het resterende gelabelde ('heet') oestradiol dat aan de receptor kan binden, wordt aangenomen dat het aan een niet-specifieke bindingsplaats bindt, omdat het ongelabelde oestradiol ('koud') in een dermate hoge concentratie aanwezig is dat het alle beschikbare specifieke bindingsplaatsen op de receptor inneemt;
 - c. in afwezigheid van ongelabeld 17 β -oestradiol en in afwezigheid van ER (bepaling van de totale radioactiviteit).

Bereiding van de oplossingen van [^3H]-17 β -oestradiol, ongelabeld 17 β -oestradiol en hrER α

15. Op basis van een stamoplossing van 1 μM [^3H]-17 β -oestradiol in DMSO moet een oplossing van 40 nM [^3H]-17 β -oestradiol worden bereid door toevoeging van DMSO (tot een concentratie van 200 nM) en vervolgens testbuffer bij kamertemperatuur (tot een concentratie van 40 nM). Deze oplossing van 40 nM wordt gebruikt om de [^3H]-17 β -oestradiol-verdunningsreeks van 0,313 nM tot 40 nM te bereiden door toevoeging van testbuffer bij kamertemperatuur (zoals weergegeven in kolom 12 van tabel 2). De uiteindelijke testconcentraties, oplopend van 0,0313 tot 4,0 nM, worden verkregen door 10 μl van deze oplossingen toe te voegen aan de opeenvolgende testputjes van een microtiterplaat met 96 putjes (zie tabellen 2 en 3). De bereiding van de testbuffer, de berekening van de initiële stamoplossing van [^3H]-17 β -oestradiol op basis van de specifieke activiteit, de bereiding van de verdunningen en de bepaling van de concentraties worden uitvoerig beschreven in het protocol van de CERI-bepaling (2).

16. De verdunningen van ongelabeld 17 β -oestradiol moeten worden bereid door toevoeging van testbuffer aan een stamoplossing van 1 nM 17 β -oestradiol om zo acht concentraties te verkrijgen die in eerste instantie oplopen van 0,625 μ M tot 80 μ M. De uiteindelijke testconcentraties, oplopend van 0,0625 tot 8 μ M, worden verkregen door 10 μ l van deze oplossingen toe te voegen aan de opeenvolgende testputjes van een microtiterplaat met 96 putjes voor de meting van de niet-specifieke binding (zie tabellen 2 en 3). De bereiding van de verdunningen van ongelabeld 17 β -oestradiol wordt uitvoerig beschreven in het protocol van de CERI-bepaling (2).
17. Voor de bepaling wordt de receptorconcentratie gebruikt, waarmee een specifieke binding van 40 \pm 10 % wordt verkregen (zie de punten 12-13). De hrERA-oplossing moet vlak voor gebruik worden bereid, d.w.z. nadat de putjes voor totale binding, niet-specifieke binding en 'hete' ligand afzonderlijk al zijn bereid. Hierbij moet ijskoude testbuffer worden gebruikt.
18. De 96-putjesplaten worden ingedeeld zoals weergegeven in tabel 2, met elke concentratie van [³H]-17 β -oestradiol in drievoud. De volumes [³H]-17 β -oestradiol, ongelabeld 17 β -oestradiol, buffer en receptor zijn weergegeven in tabel 3.

Tabel 2

Microtiterplaatindeling voor de bepaling van de verzadigingsbinding

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	Voor meting van de TB			Voor meting van de NSB			Voor meting van de 'hete' ligand afzonderlijk			/	Verdunningen van ongelabeld E2 voor kolommen 4-6 van de plaat	Verdunningen van [³ H]-E2 voor kolommen 1-9 van de plaat
A	0,0313 nM [³ H]-E2+ ER			0,0313 nM [³ H]-E2+ 0,0625 μ M E2+ ER			0,0313 nM			/	0,625 μ M	0,313 nM
B	0,0625 nM [³ H]-E2+ ER			0,0625 nM [³ H]-E2+ 0,125 μ M E2+ ER			0,0625 nM			/	1,25 μ M	0,625 nM
C	0,125 nM [³ H]-E2+ ER			0,125 nM [³ H]-E2+ 0,25 μ M E2+ ER			0,125 nM			/	2,5 μ M	1,25 nM
D	0,250 nM [³ H]-E2+ ER			0,250 nM [³ H]-E2+ 0,5 μ M E2+ ER			0,250 nM			/	5 μ M	2,5 nM
E	0,50 nM [³ H]-E2+ ER			0,50 nM [³ H]-E2+ 1 μ M E2+ ER			0,50 nM			/	10 μ M	5 nM
F	1,00 nM [³ H]-E2+ ER			1,00 nM [³ H]-E2+ 2 μ M E2+ ER			1,00 nM			/	20 μ M	10 nM
G	2,00 nM [³ H]-E2+ ER			2,00 nM [³ H]-E2+ 4 μ M E2+ ER			2,00 nM			/	40 μ M	20 nM
H	4,00 nM [³ H]-E2+ ER			4,00 nM [³ H]-E2+ 8 μ M E2+ ER			4,00 nM			/	80 μ M	40 nM

TB: totale binding

NSB: niet-specifieke binding

[³H]-E2: [³H]-17 β -oestradiolE2: ongelabeld 17 β -oestradiol

(*) De hier vermelde concentraties zijn de eindconcentraties in elk putje.

(**) De verdunningen van het ongelabelde E2 en het [³H]-E2 mogen in verschillende platen worden bereid.

Tabel 3

Reagensvolumes voor de microtiterplaat voor de verzadigingsbepaling

Kolomnummer		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Vorbereidende stappen		TB-putjes			NSB-putjes			'Hete' ligand afzonderlijk		
Volume componenten voor betreffende reactie-putjes en volgorde toevoeging	Buffer	60 µl			50 µl			90 µl		
	ongelabelde E2 uit tabel 2, kolom 11	-			10 µl			-		
	[³ H]-E2 uit tabel 2, kolom 12	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			-		
Totaal reactievolume		100 µl			100 µl			100 µl		
Incubatie		NA 2 UUR REACTIE TIJDENS INCUBATIE						Kwantificering van de radioactiviteit vlak na bereiding. Geen incubatie		
Behandeling met 0,4 % DCC		Ja			Ja			Nr.		
Volume 0,4 % DCC		100 µl			100 µl			-		
Filtratie		Ja			Ja			Nr.		
METING DPM										
Kwantificering aan het scintillatiemengsel toegevoegd volume		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Als voor het bepalen van het aantal dpm een vloeistofscintillatieteller voor microtiterplaten wordt gebruikt, kan de 'hete' ligand afzonderlijk niet in dezelfde plaat worden bereid als de TB- en NSB-putjes. De 'hete' ligand afzonderlijk moet in dat geval in een andere plaat worden bereid.

(**) Als de DCC wordt gescheiden door middel van centrifugatie, moet voor de vloeistofscintillatietelling 50 µl van het supernatans worden gebruikt om verontreiniging met de DCC te vermijden.

19. De microtiterplaten voor de bepaling van de totale binding en de niet-specifieke binding moeten twee uur worden geïncubeerd bij kamertemperatuur (22 °C to 28 °C).

Meting van aan de hrERα gebonden [³H]-17β-oestradiol

20. Na twee uur incuberen moet het aan de hrERα gebonden [³H]-17β-oestradiol worden gescheiden van het vrije [³H]-17β-oestradiol door 100 µl van een ijskoude 0,4 % DCC-suspensie aan de putjes toe te voegen. Vervolgens moeten de platen 10 minuten op ijs worden geplaatst, waarna het reactiemengsel en de DCC-suspensie moeten worden gefilterd met behulp van een filter voor microtiterplaten om de DCC te verwijderen. 100 µl van het filtraat moet worden toegevoegd aan scintillatievloeistof in scintillatieflesjes om het aantal desintegraties per minuut (dpm) per flesje te meten door middel van vloeistofscintillatietelling.
21. Als er geen filter voor microtiterplaten beschikbaar is, kan de DCC door middel van centrifugatie worden verwijderd. Vervolgens moet er uiterst voorzichtig, om verontreiniging van de putjes door aanraking van de DCC te vermijden, 50 µl van het supernatans met aan de hrERα gebonden [³H]-17β-oestradiol worden genomen en voor de scintillatietelling worden gebruikt.

22. De meting van de 'hete' ligand afzonderlijk wordt gebruikt om het aantal desintegraties per minuut (dpm) van het aan de testputjes toegevoegde [^3H]-17 β -oestradiol te bepalen. De radioactiviteit moet direct na de bereiding worden gemeten. Deze putjes moeten worden niet geïncubeerd of met DCC-suspensie behandeld; de inhoud ervan moet rechtstreeks in de scintillatievloeistof worden overgebracht. Deze metingen tonen aan hoeveel [^3H]-17 β -oestradiol er, uitgedrukt in dpm, werd toegevoegd aan elke reeks putjes voor de totale binding en de niet-specifieke binding.

Bepaling van de competitieve binding

23. Bij de bepaling van de competitieve binding wordt de binding van één concentratie [^3H]-17 β -oestradiol in aanwezigheid van oplopende concentraties van de teststof gemeten. Binnen een testrun moeten er voor elke concentratie drie gelijktijdige dublobepalingen worden toegepast. Bovendien moeten er voor elke geteste chemische stof drie niet-gelijktijdige testruns worden uitgevoerd. Voor de bepaling moeten een of meer microtiterplaten met 96 putjes worden gebruikt.

Controles

24. Bij de uitvoering van de bepaling moeten in elk experiment gelijktijdig het oplosmiddel en controles (d.w.z. referentie-oestrogeen, zwakke binder en niet-binder) worden opgenomen. Tijdens elke testrun moeten volledige concentratiecurven voor het referentie-oestrogeen en de controles (d.w.z. zwakke binder en niet-binder) in één plaat worden gebruikt. Alle andere platen moeten i) een hoge (maximale verdrijving, d.w.z. nagenoeg volledige verdrijving van de radioactief gelabelde ligand) en een middelhoge (bij benadering de IC_{50}) concentratie van E2 en de zwakke binder in drievoud bevatten, en ii) oplosmiddelcontrole en niet-specifieke binding, elk in drievoud. De procedures voor de bereiding van de testbuffer en de [^3H]-17 β -oestradiol-, hrER α - en teststofoplossingen worden uitvoerig beschreven in het protocol van de CERI-bepaling (2).

Oplosmiddelcontrole:

25. De oplosmiddelcontrole bevestigt dat er geen interactie optreedt tussen het oplosmiddel en het testsysteem en meet bovendien de totale binding (TB). Als oplosmiddel wordt bij voorkeur DMSO gebruikt. Als de hoogste concentratie teststof niet in DMSO oplosbaar is, mag ook ethanol worden gebruikt. De uiteindelijke DMSO-concentratie in de testputjes moet 2,05 % zijn en mag, als de teststof onvoldoende oplost, worden verhoogd tot maximaal 2,5 %. DMSO-concentraties van meer dan 2,5 % mogen niet worden gebruikt, omdat hogere oplosmiddelconcentraties de bepaling verstoren. Voor teststoffen die niet oplosbaar zijn in DMSO, maar wel in ethanol, kan maximaal 2 % ethanol worden gebruikt zonder dat dit de bepaling verstoort.

Buffercontrole:

26. De buffercontrole (BC) mag geen oplosmiddel of teststof bevatten, maar wel alle andere componenten van de bepaling. De resultaten van de buffercontrole worden vergeleken met de oplosmiddelcontrole om te verifiëren dat het oplosmiddel het testsysteem niet beïnvloedt.

Sterke binder (referentie-oestrogeen)

27. 17 β -oestradiol (CAS 50-28-2) is de endogene ligand en bindt met hoge affiniteit aan de oestrogeenreceptor, alfa-subtype. Voor elke bepaling van de competitieve binding aan de hrER α moet een standaardcurve worden gemaakt met behulp van ongelabeld 17 β -oestradiol, om de variabiliteit bij gebruik van de bepaling in de loop van de tijd in hetzelfde laboratorium te kunnen beoordelen. Er moeten acht concentraties ongelabeld 17 β -oestradiol in DMSO en testbuffer worden bereid, waarbij de eindconcentraties in de testputjes voor de standaardcurve als volgt zijn gespreid: 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , $10^{-8,5}$, 10^{-9} , $10^{-9,5}$, 10^{-10} , 10^{-11} M. De hoogste concentratie ongelabeld 17 β -oestradiol (1 μM) dient als indicator voor niet-specifieke binding. Deze concentratie wordt in tabel 4 aangeduid met het label „NSB”, maar is ook onderdeel van de standaardcurve.

Zwakke binder

28. In de test moet een zwakke binder (noretynodrel (CAS RN 68-23-5), of als alternatief norethisteron (CAS RN 68-22-4)) worden opgenomen om van elk experiment de gevoeligheid aan te tonen en om de variabiliteit te kunnen beoordelen bij gebruik van de bepaling in de loop van de tijd. Er moeten acht concentraties zwakke binder in DMSO en testbuffer worden bereid, waarbij de eindconcentraties in de testputjes als volgt zijn gespreid: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6} , $10^{-6,5}$, 10^{-7} , $10^{-7,5}$, 10^{-8} en 10^{-9} M.

Niet-binder

29. Als negatieve controle (niet-binder) moet octyltriëthoxysilaan (OTES, CAS RN 2943-75-1) worden gebruikt. Hiermee wordt geverifieerd of de bepaling, zoals ze wordt uitgevoerd, teststoffen die niet aan de hrERa binden, wel detecteert. Er moeten acht concentraties niet-binder in DMSO en testbuffer worden bereid, waarbij de eindconcentraties in de testputjes als volgt zijn gespreid: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M. Als alternatief kan ook di-n-butylftalaat (DBP, CAS 84-72-2) als niet-binder worden gebruikt, maar slechts tot 10^{-4} M. De maximale oplosbaarheid van DBP in de bepaling is vastgesteld op 10^{-4} M.

hrERa-concentratie

30. Voor de bepaling wordt de hoeveelheid receptoren gebruikt waarmee een specifieke binding van $40 \pm 10\%$ wordt verkregen (zie de punten 12-13 van aanhangsel 3). De hrERa-oplossing moet vlak voor gebruik worden bereid door verdunning van de functionele hrERa in ijskoude testbuffer.

[³H]-17β-oestradiol

31. De eindconcentratie [³H]-17β-oestradiol in de testputjes moet 0,5 nM bedragen.

Teststoffen

32. Vooraf moet voor elke stof een oplosbaarheidstest worden verricht om de oplosbaarheidsgrens vast te stellen en om het passende concentratiebereik te bepalen dat bij de uitvoering van het testprotocol moet worden aangehouden. De oplosbaarheidsgrens van elke teststof wordt eerst bepaald in het oplosmiddel en nader bevestigd onder de omstandigheden van de bepaling. De uiteindelijk in de bepaling te testen concentratie mag niet hoger zijn dan 1 mM. De bereikbepalingstest bestaat uit een oplosmiddelcontrole samen met een logaritmische reeks van acht verdunningen, beginnend bij de maximaal aanvaardbare concentratie (bv. 1 mM of lager, afhankelijk van de oplosbaarheidsgrens), waarbij de aanwezigheid van troebelheid of neerslag moet worden opgemerkt (zie ook punt 35 van aanhangsel 3). Wanneer het concentratiebereik voor de bepaling is bepaald, moet de teststof worden getest in een logaritmische reeks van 8 concentraties met passende intervallen zoals vastgesteld in de voorafgaande bereikbepalingstest. De in het tweede en het derde experiment geteste concentraties moeten voor zover nodig verder worden aangepast om de concentratie-responscurve beter te kunnen karakteriseren.
33. De verdunningen van de teststof moeten worden bereid in het geschikte oplosmiddel (zie punt 25 van aanhangsel 3). Als de hoogste concentratie van de teststof niet oplosbaar is in DMSO of ethanol en de toevoeging van meer oplosmiddel ertoe zou leiden dat de oplosmiddelconcentratie in het putje aan het eind van de bepaling boven de maximaal aanvaardbare concentratie komt, mag de op een na hoogste concentratie als hoogste concentratie worden genomen. In dat geval kan aan de onderkant van de concentratiereeks een aanvullende concentratie worden toegevoegd. De andere concentraties in de reeks moeten onveranderd blijven.
34. Als de teststofoplossingen aan de testputjes worden toegevoegd, moet goed worden opgelet of er geen neerslag ontstaat. Bij het fitten van de curven moeten de gegevens voor alle putjes met neerslag worden uitgesloten en moet de reden voor deze uitsluiting worden vermeld.
35. Als er gegevens uit andere bronnen voorhanden zijn waaraan een $\log(\text{IC}_{50})$ van een teststof kan worden ontleend, kan het zinvol zijn om de verdunningen geometrisch dichter rond de verwachte $\log(\text{IC}_{50})$ te spreiden, (bv. met 0,5 logeenheden). De uiteindelijke resultaten moeten een voldoende breed concentratiebereik aan weerszijden van $\log(\text{IC}_{50})$ bestrijken, inclusief de „top” en de „basis”, dat breed genoeg is om de bindingscurve naar behoren te kunnen karakteriseren.

Testplaatindeling

36. Er moeten gemarkeerde microtiterplaten worden voorbereid met incubaties in zesvoud voor de oplosmiddelcontrole, de hoogste concentratie van het referentie-oestrogeen (E2), die ook als indicator voor niet-specifieke binding (NSB) dient, de buffercontrole, en drie incubatieduplo's voor elk van de acht concentraties van de niet-bindende controle (octyltriëthoxysilaan), de zeven lagere concentraties van het referentie-oestrogeen (E2), de acht concentraties van de zwakke binder (noretynodrel of norethisteron) en de acht concentraties van elke teststof (TC). In tabel 4 wordt een voorbeeld gegeven van een plaatindelingsdiagram voor de volledige concentratiecurven van het referentie-oestrogeen en de controles. Voor de teststof worden aanvullende microtiterplaten gebruikt. Deze moeten ook de volgende plaatcontroles bevatten: i) een hoge (maximale verdrijving) en een middelhoge (bij benadering de IC_{50}) concentratie van E2 en de zwakke binder in drievoud; ii) oplosmiddelcontrole (als totale binding) en niet-specifieke binding, elk in zesvoud (tabel 5). In aanhangsel 3.3 is een voorbeeld opgenomen van een werkblad met de microtiterplaatindeling voor een competitieve bepaling met drie onbekende teststoffen. De in het werkblad en in de tabellen 4 en 5 aangegeven concentraties verwijzen naar de eindconcentraties in elk testputje. De maximale concentratie E2 moet 1×10^{-7} M bedragen en voor de zwakke binder moet de hoogste concentratie van de zwakke binder in plaat 1 worden gebruikt. De IC_{50} -concentratie moet door het laboratorium worden bepaald op basis van zijn historische controledatabank. Verwacht wordt dat deze waarde ongeveer gelijk zal zijn aan de waarde die in de valideringsstudies werd waargenomen (zie tabel 1).

Tabel 4

Microtiterplaatindeling voor de bepaling van de competitieve binding ⁽¹⁾ ⁽²⁾, volledige concentratiecurven voor het referentie-oestrogeen en de controles (plaat 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Buffercontrole en positieve controle (E2)			Zwakke positieve controle (noretynodrel)			Negatieve controle (OTES)			TB en NSB		
A	Blanco (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (oplosmiddelcontrole) (2,05 % DMSO)		
B	1×10^{-11} M			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	1×10^{-10} M			$1 \times 10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	$1 \times 10^{-9,5}$ M			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	1×10^{-9} M			$1 \times 10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Buffercontrole		
F	$1 \times 10^{-8,5}$ M			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	1×10^{-8} M			$1 \times 10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Blanco (voor 'heet') (**)		
H	1×10^{-7} M			$1 \times 10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

⁽¹⁾ Voorbeeldindeling voor de microtiterplaat met standaarden die gelijktijdig met elk experiment gerund moet worden.

⁽²⁾ Er zij op gewezen dat voor deze microtiterplaat de verdunningen worden gebruikt die zijn bereid in de verdunningsplaat voor de standaarden zoals beschreven in de voorgaande secties.

In dit voorbeeld is de zwakke binder noretynodrel (NE)

(*) een echte blanco, putje wordt niet gebruikt

(**) blanco wordt niet gebruikt tijdens de incubatie, maar wel ter bevestiging van de totaal toegevoegde radioactiviteit.

Tabel 5

Microtiterplaatindeling voor de bepaling van de competitieve binding, aanvullende platen voor teststoffen (TC) en plaatcontroles

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Teststof 1 (TC-1)			Teststof 2 (TC-2)			Teststof 3 (TC-3)			Controles		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7} M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E2 (IC ₅₀)		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1 \times 10^{-4,5}$ M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC ₅₀)		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (oplosmiddelcontrole)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

In dit voorbeeld is de zwakke binder noretynodrel (NE)

Afronding van de bepaling van de competitieve binding

37. Met uitzondering van de putjes voor totale binding en de blanco's (voor 'heet'), zoals weergegeven in tabel 6, moet aan elk putje 50 µl testbuffer worden toegevoegd, die eerst gemengd wordt met respectievelijk 10 µl oplosmiddelcontrole, referentie-oestrogeen (E2), zwakke binder, niet-binder, en teststoffen, en dan met 10 µl van een 5 nM [³H]-17β-oestradioloplossing. Vervolgens wordt aan elk putje 30 µl ijskoude receptoroplossing toegevoegd, waarna voorzichtig wordt gemengd. De hrERA-oplossing moet als laatste reagens worden toegevoegd. De microtiterplaten moeten 2 uur worden geïncubeerd bij kamertemperatuur (22° tot 28 °C).

Tabel 6

Het volume van de testcomponenten voor de bepaling van de competitieve binding aan de hrER, microtiterplaten

Stappen van de bereiding		Alle putjes behalve TB	TB-putjes	Blanco (voor 'heet')
Volume componenten voor betreffende reactieputjes en volgorde toevoeging	Testbuffer bij kamertemperatuur	50 µl	60 µl	90 µl
	Ongelabeld E2, zwakke binder, niet-binder, oplosmiddel en teststoffen (*)	10 µl	-	-
	[³ H]-17β-oestradiol om op een eindconcentratie van 0,5 nM te komen (d.w.z. 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	Vooraf bepaalde hrERA-concentratie (zie punten 12-13)	30 µl	30 µl	-
Totaal volume in elk testputje		100 µl	100 µl	100 µl

(*) zodanig bereid dat een aanvaardbare eindconcentratie oplosmiddel wordt verkregen

38. Nadat het aan de hrER α gebonden [^3H]-17 β -oestradiol door de toevoeging aan elk putje van 100 μl ijskoude DCC-suspensie is gescheiden van het vrije [^3H]-17 β -oestradiol, moet het aan de hrER α gebonden [^3H]-17 β -oestradiol worden gekwantificeerd zoals beschreven in de punten 21-23 van aanhangsel 3 voor de bepaling van de verzadigingsbepaling.
39. De putjes G10-12 en H10-12 (in tabel 4 aangeduid als blanco's (voor 'heet')) vertegenwoordigen de desintegraties per minuut (dpm) van het [^3H]-oestradiol in 10 μl . Het aliquot van 10 μl moet direct aan de scintillatievloeistof worden toegevoegd.

Aanvaardbaarheidscriteria

Bepaling van de verzadigingsbinding

40. Naarmate de gebruikte concentratie [^3H]-17 β -oestradiol oploopt, moet de curve voor de specifieke binding een plateau bereiken, waaruit blijkt dat de hrER α verzadigd raakt met ligand.
41. De specifieke binding bij 0,5 nM [^3H]-17 β -oestradiol moet binnen het aanvaardbare bereik van 30 % tot 50 % van het gemiddelde van de in totaal gemeten radioactiviteit over alle testruns blijven. Incidentele, lichte afwijkingen buiten dit bereik zijn aanvaardbaar, maar als testruns structureel buiten dit bereik uitkomen of als voor een bepaalde testrun de specifieke binding ver erbuiten ligt, moet de eiwitconcentratie worden aangepast en moet de bepaling van de verzadigingsbinding worden herhaald.
42. De gegevens moeten een lineaire Scatchard-plot opleveren.
43. Er mag niet te veel niet-specifieke binding optreden. In het algemeen moet de waarde voor de niet-specifieke binding < 35 % van de totale binding zijn. Incidenteel mag de verhouding deze grens evenwel overschrijden bij het meten van zeer lage aantallen dpm voor de laagst geteste concentratie radioactief gelabeld 17 β -oestradiol.

Bepaling van de competitieve binding

44. Naarmate de concentratie ongelabeld 17 β -oestradiol oploopt, moet het [^3H]-17 β -oestradiol van de receptor verdrijven op een manier die past bij competitieve binding op één bindingsplaats.
45. De IC₅₀-waarde voor het referentie-oestrogeen (d.w.z. 17 β -oestradiol) moet ongeveer gelijk zijn aan de molaire concentratie [^3H]-17 β -oestradiol plus de K_d zoals bepaald in de bepaling van de verzadigingsbinding.
46. De totale specifieke binding moet steeds binnen het aanvaardbare bereik van 40 \pm 10 % blijven, wanneer het gemiddelde van de gemeten concentratie van de totale radioactiviteit die aan elk putje is toegevoegd, voor alle testruns 0,5 nM is. Incidentele, lichte afwijkingen buiten dit bereik zijn aanvaardbaar, maar als testruns structureel buiten dit bereik uitkomen of als voor een bepaalde testrun de specifieke binding ver erbuiten ligt, moet de eiwitconcentratie worden aangepast.
47. Het oplosmiddel mag geen invloed hebben op de gevoeligheid en reproduceerbaarheid van de bepaling. De resultaten van de oplosmiddelcontrole (TB-putjes) worden vergeleken met de buffercontrole om te verifiëren dat het oplosmiddel het testsysteem niet beïnvloedt. Als het oplosmiddel geen invloed heeft op de bepaling, moeten de resultaten van de oplosmiddel- en de buffercontrole vergelijkbaar zijn.
48. De niet-binder mag niet meer dan 25 % van het [^3H]-17 β -oestradiol van de hrER α verdrijven, wanneer wordt getest tot 10⁻³ M (OTES) of 10⁻⁴ M (DBP).

49. De prestatiecriteria voor het referentie-oestrogeen en de twee zwakke binders (bv. noretynodrel of norethisteron) zijn tot stand gekomen op basis van gegevens uit de valideringsstudie voor de CERI-hrER-bindingsbepaling (bijlage N van referentie 2). De 95 %-betrouwbaarheidsintervallen komen voort uit de gemiddelden \pm SD (n) van alle controleruns in de vier laboratoria die aan de valideringsstudie hebben deelgenomen. Er zijn 95 %-betrouwbaarheidsintervallen berekend voor de curvefittingsparameters (d.w.z. top, basis, Hill-coëfficiënt en $\log(IC_{50})$) van het referentie-oestrogeen en de zwakke binders en voor de $\log_{10}RBA$ van de zwakke binders ten opzichte van het referentie-oestrogeen. In tabel 1 zijn de verwachte bereiken voor de curvefittingsparameters weergegeven, die als prestatiecriteria kunnen worden gebruikt. In de praktijk kan het bereik van de IC_{50} licht variëren afhankelijk van de experimenteel afgeleide K_d van het receptorpreparaat en de voor de bepaling gebruikte ligandconcentratie.
50. Voor de curvefittingsparameters voor de teststoffen zijn geen prestatiecriteria opgesteld vanwege het brede spectrum aan bestaande potentiële teststoffen en de varia in potentiële affiniteiten en uitslagen (bv. volledig gefitte, gedeeltelijk gefitte of geen gefitte curve). De resultaten van elke testrun voor een teststof moeten evenwel worden geëvalueerd op basis van professioneel oordeel. Er moet een voldoende breed bereik van concentraties van de teststof worden gebruikt om de top van de competitieve curve (bv. 90-100 % binding) duidelijk te kunnen bepalen. De variabiliteit tussen de duplo's van elke teststofconcentratie en tussen de drie gelijktijdige testruns moet binnen redelijke grenzen blijven en wetenschappelijk verdedigbaar zijn. De controles van elke testrun voor een teststof moeten de voor deze CERI-bepaling gerapporteerde prestatiegegevens benaderen en consistent zijn met de historische controlegegevens van elk betreffende laboratorium.

ANALYSE VAN DE GEGEVENS

Bepaling van de verzadigingsbinding

51. Zowel de totale als de niet-specifieke binding wordt gemeten. Op basis van deze waarden wordt de specifieke binding van oplopende concentraties [3H]-17 β -oestradiol in evenwichtstoestand berekend door de niet-specifieke binding van de totale binding af te trekken. Wanneer de specifieke binding wordt uitgezet tegen de concentratie [3H]-17 β -oestradiol moet de grafiek een plateau bereiken voor de maximale specifieke binding, die overeenkomt met de verzadiging van de hrER α met het [3H]-17 β -oestradiol. Bovendien moet een analyse van de gegevens blijken geven van de binding van het [3H]-17 β -oestradiol aan één bindingsplaats met een hoge affiniteit. De curve voor de verzadigingsbinding moet de niet-specifieke, totale en specifieke binding weergeven. Voor de verdere analyse van deze gegevens moet een niet-lineaire regressieanalyse worden gebruikt (bv. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995), waarna de gegevens worden gepresenteerd in de vorm van een Scatchard-plot.
52. Bij de analyse van de gegevens moeten B_{max} en K_d worden bepaald op basis van alleen de gegevens voor de totale binding, waarbij wordt aangenomen dat de niet-specifieke binding lineair is, tenzij het gebruik van een andere methode wordt onderbouwd. Bovendien moet voor het bepalen van de beste fit robuuste regressie worden toegepast, tenzij een rechtvaardiging wordt gegeven voor een afwijkende keuze. De robuuste-regressiemethode moet worden vermeld. Bij het bepalen van B_{max} en K_d uit gegevens voor de verzadigingsbinding moet altijd worden gecorrigeerd voor liganddepletie (bv. met behulp van de methode van Swillens, 1995).

Bepaling van de competitieve binding

53. De competitievebindingscurve wordt uitgezet als de specifieke binding van [3H]-17 β -oestradiol tegen de concentratie (\log_{10} -eenheden) van de competitor. De concentratie waarbij de teststof de maximale specifieke binding van [3H]-17 β -oestradiol voor 50 % remt, is de IC_{50} -waarde.
54. De $\log(IC_{50})$ -waarden voor de positieve controles (bv. het referentie-oestrogeen en de zwakke binder) moeten worden geschat met behulp van software voor niet-lineaire fitting van de curve die geschikt is voor het fitten van een Hill-vergelijking met vier parameters (bv. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Bij het fitten van de curven moeten de top, basis, Hill-coëfficiënt, en $\log(IC_{50})$ over het algemeen onbegrensd blijven. Voor het bepalen van de beste fit moet robuuste regressie worden toegepast, tenzij een rechtvaardiging wordt gegeven voor een afwijkende keuze. Er moet niet worden gecorrigeerd voor liganddepletie. Na de eerste analyse moet voor elke bindingscurve worden geverifieerd op een goede fit ten opzichte van het model. De relatieve bindingsaffiniteit (RBA) voor de zwakke binder moet worden berekend als een percentage van de $\log(IC_{50})$ voor de zwakke binder ten opzichte van de $\log(IC_{50})$ voor 17 β -oestradiol. De resultaten van de positieve controles en de controle met de niet-binder moeten worden beoordeeld aan de hand van de maatstaven voor de prestaties van de bepaling in de punten 44-49 van aanhangsel 3.

55. De gegevens voor alle teststoffen moeten worden geanalyseerd volgens een trapsgewijze benadering, zodat de gegevens correct worden beoordeeld en elke competitievebindingscurve correct wordt ingedeeld. Aanbevolen wordt om elke testrun voor een teststof eerst te onderwerpen aan een gestandaardiseerde gegevensanalyse die identiek is aan de gegevensanalyse die werd gebruikt voor het referentie-oestrogeen en de zwakkebindercontroles (zie punt 54 van aanhangsel 3). Zodra deze is afgerond, moet een technische beoordeling van de curvefittingsparameters worden verricht, alsmede een visuele inspectie van de mate waarin de gegevens overeenkomen met de gegenereerde competitievebindingscurve voor elke testrun. Bij deze technische beoordeling zijn een waargenomen concentratie-afhankelijke afname van het percentage specifiek gebonden [^3H]-17 β -oestradiol, een geringe variabiliteit tussen de technische duplo's van elke teststofconcentratie en de consistentie in de fittingsparameters tussen de drie testruns een goede indicatie dat de bepaling en de gegevensanalyses correct zijn uitgevoerd.

Gegevensinterpretatie

56. Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt een teststof als binder voor de hrER α beschouwd als er een bindingscurve kan worden gefit en het laagste punt op de responscurve binnen het bereik van de gegevens overeenkomt met minder dan 50 % binding (figuur 1).

57. Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt een teststof als niet-binder voor de hrER α beschouwd als:

- er een bindingscurve gefit kan worden en het laagste punt op de gefitte responscurve binnen het bereik van de gegevens overeenkomt met meer dan 75 % binding, of
- er geen bindingscurve kan worden gefit en het laagste, niet-afgevlakte gemiddelde bindingspercentage van alle concentratiegroepen binnen de gegevens overeenkomt met meer dan 75 % binding.

58. Als aan geen van de bovenstaande voorwaarden wordt voldaan (bv. als het laagste punt op de gefitte responscurve overeenkomt met 76 tot 51 % binding) wordt de teststof als 'onduidelijk' beschouwd.

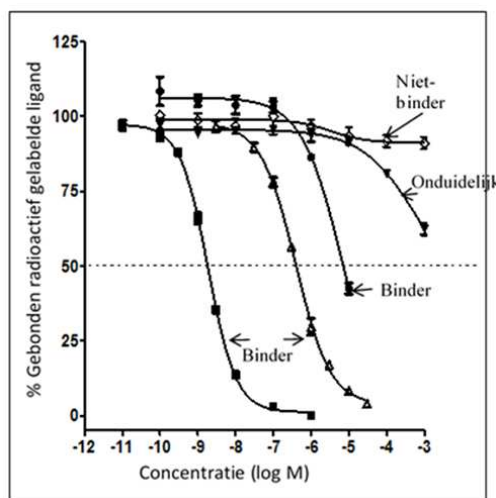
Tabel 7

Criteria voor de indeling van een teststof op basis van de competitievebindingscurve

Indeling	Criterium
Binder ^a	Er kan een curve worden gefit. Het laagste punt op de responscurve binnen het bereik van de gegevens komt overeen met minder dan 50 % binding.
Niet-binder ^b	Als er een curve kan worden gefit, komt het laagste punt op de gefitte responscurve binnen het bereik van de gegevens overeen met meer dan 75 % binding. Als er geen curve kan worden gefit, komt het laagste, niet-afgevlakte gemiddelde bindingspercentage van alle concentratiegroepen binnen de gegevens overeen met meer dan 75 % binding.
Onduidelijk ^c	Een beoordeelbare testrun die noch als binder, noch als niet-binder kan worden ingedeeld (bv. het laagste punt op de gefitte responscurve komt overeen met 76 tot 51 % binding).

Figuur 1

Voorbeelden van de indeling van een teststof met behulp van een competitiebindingscurve.



59. De verschillende testruns die binnen een laboratorium voor een teststof zijn uitgevoerd, worden gecombineerd door aan elke testrun numerieke waarden toe te kennen en het gemiddelde van deze waarden te nemen, zoals weergegeven in tabel 8. De resultaten van de gecombineerde testruns binnen elk laboratorium worden vergeleken met de verwachte indeling voor elke teststof.

Tabel 8

Methode voor de indeling van een teststof op basis van meerdere testruns binnen hetzelfde laboratorium

Toekenning van een waarde aan elke testrun:	
Indeling	Numerieke waarde
Binder	2
Onduidelijk	1
Niet-binder	0
Indeling op basis van het gemiddelde van de numerieke waarden van de testruns:	
Indeling	Numerieke waarde
Binder	Gemiddelde $\geq 1,5$
Onduidelijk	$0,5 \leq$ Gemiddelde $< 1,5$
Niet-binder	Gemiddelde $< 0,5$

TESTVERSLAG

60. Zie punt 24 van „COMPONENTEN VAN DE hrER-BINDINGSBEPALING” van deze testmethode.