

14 DECEMBER 1998. - Koninklijk besluit tot wijziging van het koninklijk besluit van 24 mei 1982 houdende reglementering van het in de handel brengen van stoffen die gevaarlijk kunnen zijn voor de mens of voor zijn leefmilieu

Bijlage II D

"B.7 TOXICITEIT (ORAAAL) BIJ HERHAALDE TOEDIENING (28 DAGEN)

1. METHODE

1.1 Inleiding

Zie algemene inleiding deel B

1.2. Definities

Zie algemene inleiding deel B

1.3. Principe van de testmethode

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

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

1.4. Beschrijving van de testmethode

1.4.1. Voorbereidingen

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

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

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

1.4.2. Proefomstandigheden

1.4.2.1. Proefdieren

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

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

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

1.4.2.2. Aantal en geslacht

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

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

1.4.2.3. Dosisniveaus

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

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

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

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

gegeven en zo nodig worden aangepast om een constant dosisniveau per kg lichaamsgewicht te handhaven.

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

1.4.2.4. Limiettest

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

1.4.2.5. Observatieperiode

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

1.4.3. Procedure

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

1.4.3.1. Algemene observaties

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

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

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

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

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

1.4.3.2. Lichaamsgewicht en voedsel/waterconsumptie

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

1.4.3.3. Hematologie

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

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

1.4.3.4. Klinische biochemie

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

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

Verder moet een onderzoek naar serummarkers van algemene weefselschade overwogen worden. Andere onderzoeken die moeten worden uitgevoerd als van de teststof bekend is, of vermoed wordt, dat zij de desbetreffende metabolische

profielen beïnvloedt, zijn : calcium, fosfaat, triglyceriden (nuchterwaarde), specifieke hormonen, methemoglobine en cholesterinase. Deze moeten in het geval van teststoffen uit bepaalde klassen c.q. van geval tot geval worden geïdentificeerd.

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

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

1.4.3.5. Macroscopische necropsie

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

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

1.4.3.6. Histopathologisch onderzoek

Bij de dieren in de met de hoogste dosisniveau behandelde groep en bij de dieren

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

Alle grotere laesies moeten worden onderzocht.

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

2. GEGEVENS

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

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

3. RAPPORTAGE

Verslag van het onderzoek

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

Proefdieren :

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

Proefomstandigheden :

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

Resultaten :

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

Bespreking van de resultaten.

Conclusies

4. LITERATUUR

Deze methode komt overeen met TG 407 van de OESO. "

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 14 december 1998.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid,
M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,
Mevr. M. SMET

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,
J. PEETERS

Voetnoot

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

Voor vragen en/of opmerkingen over EMIS kunt u mailen naar emis@vito.be

Copyright © [VITO](http://www.vito.be) 18/01/1999

Ontwerp [EMIS](http://www.emis.vito.be).