AFSNIT B: METODER TIL BESTEMMELSE AF TOKSICITET OG ANDRE SUNDHEDSVIRKNINGER

GENEREL INDLEDNING: AFSNIT B

A. FORKLARENDE BEMAERKNINGER

Til denne indledning anvendes foelgende nummerering:

B.15 Genmutation - Saccharomyces cerevisiae

B.16 Mitotisk rekombination - Saccharomyces cerevisiae

B.17 Genmutationstest - pattedyrceller in vitro

B.18 DNA-skade og DNA-reparation - Unscheduled DNA synthesis - pattedyrceller in vitro

B.19 Soesterkromatidombytning (SCE) in vitro

B.20 Koensbundet recessiv letal test - Drosophila melanogaster

B.21 Celletransformationstest - pattedyrceller in vitro

B.22 Dominant letal test - gnavere

B.23 TEST FOR KROMOSOMABERRATIONER I SPERMATOGONIER HOS PATTEDYR

B.24 Spottest - mus

B.25 Arvelig translokation hos mus

B.26 Subkronisk toksicitet, oral indgift: 90 dages gentagen oral indgift til gnavere

B.27 Subkronisk toksicitet, oral indgift: 90 dages gentagen oral indgift under anvendelse af andre dyrearter end gnavere

B.28 Subkronisk toksicitet, optagelse gennem huden: 90 dages gentagen dosering paa hud under anvendelse af gnavere

B.29 Subkronisk toksicitet, inhalation: 90 dages gentagen inhalation under anvendelse af gnavere

B.30 Undersoegelse af kronisk toksicitet

B.31 Teratogenicitetsundersoegelse i gnavere og ikke-gnavere

B.32 Carcinogenicitetsundersoegelse

B.33 Kombineret undersoegelse af carcinogenicitet/kronisk toksicitet

B.34 Reproduktionstoksicitetsundersoegelse i en generation

B.35 Reproduktionstoksicitetsundersoegelse i to generationer

B.36 Toksikokinetik

B. GENERELLE DEFINITIONER PAA TERMER, DER ER ANVENDT I TESTMETODERNE I DETTE BILAG

i) Akut toksicitet: de skadelige virkninger, der optraeder inden for et givet tidsrum (saedvanligvis 14 dage) efter udsaettelse for en enkelt dosis af et teststof.

ii) Tydelige tegn paa toksicitet: generel term til beskrivelse af klare tegn paa toksicitet efter indgift af teststoffet. Disse tegn boer vaere tilstraekkelige som grundlag for risikovurdering og vaere
af en saadan art, at en foroegelse af dosen kan forventes at resultere i udvikling af alvorlige tegn paa toksicitet og sandsynlighed for doedelighed.

iii) Dosis: maengden af indgivet teststof. Dosis udtrykkes som vaegt (gram eller milligram) eller som
vaegt af teststoffet pr. vaegtenhed af forsoegsdyr (f.eks. mg pr. kg legemsvaegt) eller som konstante
koncentrationer i foderet (milliontedele eller mg pr. kg foder).

iv) Den kritiske dosis: den hoejeste af de fire fastdosisniveauer, som kan indgives, uden at det medfoerer stofrelateret doedelighed (aflivning af etisk aarsag).

v) Dosering: generel term, der omfatter dosis, dosishyppighed og doseringens varighed.

vi) LD50 (middel letal dosis): den statistiske bestemte enkeltdosis af et teststof, som kan forventes at foraarsage 50 % af forsoegsdyrenes doed. LD50-vaerdier udtrykkes som vaegt af teststof pr.
vaegtenhed af forsoegsdyr (mg/kg).

vii) LC50 (middel letal koncentration): den statistiske bestemte koncentration af et stof, som kan

forventes at foraarsage 50 % af forsoegsdyrenes doed enten under eksponeringen eller inden for et
fastsat tidsrum efter eksponering i en bestemt periode.
LC50-vaerdier udtrykkes som vaegt af teststof pr. luftvolumenenhed ved standardbetingelser (mg/liter).
viii) NOAEL: forkortelse for no observed adverse effect level, dvs. den hoejeste dosis eller det hoejeste eksponeringsniveau, hvor der ikke iagttages skadelige behandlingsrelaterede resultater.
ix) Toksicitet ved gentagen dosering/subkronisk toksicitet: de skadelige virkninger, som iagttages
paa forsoegsdyr som foelge af dagligt gentagen indgift af eller eksponering for et kemisk stof gennem
en lille del af dyrenes forventede levetid.
x) Maksimal tolerabel dosis (MTD): den hoejeste dosis, som har toksiske virkninger uden dog i vaesentlig grad at paavirke overlevelsesgraden i det forsoeg, hvor den anvendes.
xi) Hudirritation: dannelse af inflammatoriske forandringer i huden som foelge af applikation af et
teststof.
xii) OEjenirritation: dannelse af forandringer i oejet som foelge af applikation af et teststof paa oejeaeblet.
xiii) Hudsensibilisering: (allergisk kontakteksem): immunologisk udloest hudreaktion paa et teststof.
xiv) AEtsning af huden: dannelse af irreversibel vaevsskade i huden efter applikation af et teststof
i et tidsrum fra tre minutter til fire timer.
xv) Toksikokinetik: undersoegelse af teststoffers absorption, distribution, metabolisme og udskillelse.
xvi) Absorption: den (eller de) proces(ser), hvorved et teststof traenger ind i kroppen.
xvii) Udskillelse: den (eller de) proces(ser), hvorved et teststof og/eller dets stofskifteprodukter udskilles af kroppen.
xviii) Distribution: den (eller de) proces(ser), hvorved det absorberede teststof og/eller dets stofskifteprodukter cirkulerer i og udskilles fra forskellige organer og vaev i kroppen.
xix) Metabolisme: den (eller de) proces(ser), der foraarsager strukturelle aendringer i teststoffet i kroppen enten ved enzymatiske eller non-enzymatiske reaktioner.
B.I Akut toksicitet, toksicitet ved gentagen dosis, subkronisk toksicitet og kronisk toksicitet
Et stofs akutte toksiske virkninger og dets toksiske virkninger paa enkelte organer eller hele organismen kan vurderes med en raekke toksicitetstests (metode B.1-B.5), hvorfra der efter en enkelt
dosis kan udledes et foreloebigt tegn paa toksicitet.
Afhaengigt af stoffets toksicitet kan der anvendes en graensetest i stedet for en fuldstaendig LD50-test: der er dog ikke specificeret nogen graensetest for inhalationsundersoegelser, da det ikke
har vaeret muligt at definere en enkelt graensevaerdi for eksponering ved inhalation.
Der anvendes saa vidt muligt metoder, der bruger faerrest mulige dyr eller mindsker dyrenes lidelser,
f.eks. fastdosismetoden (metode B.1.bis) og metoden til klassificering som akut toksisk (metode B.1.ter). Ved niveau 1-testning kan en undersoegelse paa en anden dyreart supplere konklusionerne af
den foerste undersoegelse. I saa fald kan der anvendes en standardtestmetode, eller metoden kan tilpasses til et mindre antal dyr.
Testen for toksicitet ved gentagen dosis (metode B.7, B.8 og B.9) omfatter vurdering af toksiske virkninger ved gentagen eksponering. Der laegges vaegt paa omhyggelige kliniske iagttagelser af

dyrene, saa der udledes flest mulige oplysninger af testen. Med disse tests skulle det vaere muligt at identificere maalorganerne for toksicitet og de toksiske og ikke-toksiske doser. Der kan vaere behov for mere tilbundsgaaende undersoegelser af disse aspekter i langtidsundersoegelser (metode
B.26-B.30 og B.33).

B.II Mutagenicitet - genotoksicitet

Ved mutagenicitet menes induktion af vedvarende, overfoerbare aendringer i maengden eller strukturen
af cellers eller organismers genetiske materiale. Disse aendringer, »mutationer«, kan beroere et enkelt gen eller gen-segmenter, en sammenhaengende raekke gener eller hele kromosomer. Virkningerne
paa hele kromosomer kan bestaa i aendringer i disses struktur og/eller antal.

Et stofs mutagene aktivitet vurderes med in vitro-tests for gen(punkt)mutationer i bakterier (metode B.13/14) og/eller for strukturelle kromosomforandringer i pattedyrceller (metode B.10). In vivo-metoder kan ogsaa accepteres, f.eks. mikronucleustesten (metode B.12) eller analyse af knoglemarvsceller i metafasen (metode B.11). Medmindre der foreligger kontraindikationer, boer in
vitro-metoder imidlertid klart foretraekkes.

Ved fremstilling af store maengder kan der kraeves supplerende undersoegelser til yderligere paavisning
af mutagenicitet eller prae-screening for carcinogenicitet og/eller til udfoerelse eller opfoelgning af en risikovurdering; disse undersoegelser kan anvendes til flere formaal: til at bekraefte resultater, der er indhentet i basisundersoegelserne; til at analysere endepunkter, der ikke er undersoegt i basisundersoegelserne, og til at paabegynde eller udvide in vivo-undersoegelser. Derfor omfatter metode B.15-B.25 baade in vivo og in vitro eukariotiske systemer samt en udvidet
raekke biologiske endepunkter. Disse tests giver oplysning om punktmutationer og andre endepunkter i
organismer, der er mere komplekse end de bakterier, som bruges i basisundersoegelserne.

Naar man planlaegger et supplerende program til undersoegelse af mutagen effekt, boer det udformes
saaledes, at det giver relevant yderligere viden om det paagaeldende stofs mutagene og/eller carcinogene potentiale.

Hvilke undersoegelser der er hensigtsmaessige i konkrete tilfaelde, afhaenger af talrige faktorer, herunder ogsaa stoffets kemiske og fysiske egenskaber, resultaterne af de indledende bakteriologiske
og cytogenetiske tests, stoffets omsaetning og indflydelse paa stofskifteprocesserne, resultaterne af
andre toksikologiske undersoegelser og den eksisterende viden om stoffets anvendelse. Valget af test
boer derfor, i betragtning af de varierende faktorer der skal tages hensyn til, ikke underlaegges et stramt skema.

Direktiv 93/67/EOEF indeholder visse generelle principper for teststrategien; den tekniske vejledning i risikovurdering indeholder mere detaljerede teststrategier, som ikke desto mindre er fleksible og kan tilpasses de konkrete omstaendigheder.

Metoder til yderligere undersoegelser er anfoert nedenfor, opdelt efter deres vigtigste genetiske endepunkt:

Undersoegelser af gen(punkt)mutationer

a) Fremad- eller tilbagemutationsundersoegelser med anvendelse af eukaryotiske mikroorganismer
(Saccharomyces cerevisiae) (metode B.15).

b) In vitro-undersoegelser af fremadmutation i pattedyrceller (metode B.17).
c) Den koensbundne recessive letale test i Drosophila melanogaster (metode B.20).
d) In vivo somatisk cellemutationstest: spottest i mus (metode B.24).
Undersoegelser af kromosomforandringer
a) In vivo cytogenetiske undersoegelser i pattedyr. Det boer overvejes at foretage in vivo analyser
af knoglemarvsceller i metafase, hvis de ikke er foretaget i den indledende vurdering (metode B.11). Endvidere kan in vivo cytogenetiske undersoegelser af koensceller inddrages (metode B.23).
b) In vitro cytogenetiske undersoegelser i pattedyrceller, hvis de ikke er foretaget i den indledende vurdering (metode B.10).
c) Dominant letal test i gnavere (metode B.22).
d) Arvelig translokation hos mus (metode B.25).
Genotoksiske virkninger - virkninger paa DNA
Genotoksicitet, kendetegnet ved potentielt skadelige virkninger paa det genetiske materiale, som ikke noedvendigvis er forbundet med mutagenicitet, kan vise sig ved induceret DNA-beskadigelse uden
direkte tegn paa mutation. Foelgende metoder med anvendelse af eukaryotiske mikroorganismer eller
pattedyrceller kan vaere velegnede til saadanne undersoegelser:
a) Mitotisk rekombination i Saccharomyces cerevisiae (metode B.16).
b) DNA-skade og DNA-reparation - unscheduled DNA synthesis i pattedyrceller (in vitro) (metode
B.18).
c) Soesterkromatidombytning i pattedyrceller (in vitro) (metode B.19).
Alternative metoder til undersoegelse for kraeftfremkaldende potentiale
Der findes tests for pattedyrcellers transformation, som maaler et stofs evne til at fremkalde morfologiske og adfaerdsmaessige aendringer i cellekulturer, der menes at vaere forbundet med maligne
transformationer - in vivo (metode B.21). Der kan bruges en raekke forskellige celletyper og transformationskriterier.
Vurdering af risikoen for arvelige effekter i pattedyr
Der findes metoder til maaling af arvelig effekt i intakte pattedyr, frembragt af gen(punkt)mutationer, som f.eks. i specifik locus test med anvendelse af mus, til maaling af koenscellemutation i foerste generation (ikke medtaget i dette bilag) eller til maaling af kromosomforandringer, som f.eks. i arvelig translokationstests i mus (metode B. 25). Saadanne metoder kan anvendes ved vurdering af den eventuelle humangenetiske risiko ved et stof. I betragtning af disse undersoegelsers komplekse karakter og det meget store antal dyr, der er behov
for, isaer til specifik locus test, skal der vaere vaegtige grunde til at gennemfoere disse undersoegelser.
B.III Carcinogenicitet
Kemiske stoffer kan beskrives som genotoksiske eller ikke-genotoksiske carcinogener, afhaengigt af
den formodede virkningsmekanisme.
Mutagenicitets/genotoksicitetsundersoegelserne kan give foreloebige oplysninger om et stofs genotoksiske kraeftfremkaldende potentiale. Yderligere oplysninger kan faas med tests for toksicitet
ved gentagen dosis, for subkronisk toksicitet eller kronisk toksicitet. Toksicitetstesten med gentagen dosis, metode B.7, og laengerevarende undersoegelser med gentagen dosis omfatter vurdering

af histopatologiske aendringer, der er iagttaget i toksicitetstests med gentagen dosis, f.eks. hyperplasi i visse vaev. Disse undersoegelser og toksikokinetiske oplysninger kan anvendes til at paavise kemiske stoffer med carcinogent potentiale, som eventuelt boer undersoeges yderligere i en
carcinogenicitetstest (metode B.32) eller ofte i en kombineret undersoegelse for kronisk toksicitet/carcinogenicitet (metode B.33).

B.IV Reproduktionstoksicitet

Reproduktionstoksicitet kan paavises paa forskellige maader (f.eks. mindskelse af reproduktionsfunktionen eller -evnen hos hanner og hunner, identificeret som »virkninger paa fertiliteten«, eller induktion af ikke-arvelige skadelige virkninger paa afkommet, identificeret som
»udviklingstoksicitet«, der ogsaa omfatter teratogenicitet og virkninger under laktation.

For teratogenicitetsundersoegelserne, som indgaar i udviklingstoksicitetstestningen, er testmetoden
(metode B.31) primaert beregnet paa oral indgift. Som alternativ kan andre indgiftsveje anvendes,
afhaengigt af teststoffets fysiske egenskaber eller den sandsynlige eksponeringsvej for mennesker. I
saadanne tilfaelde tilpasses testmetoden under hensyntagen til de relevante elementer i 28 dages-undersoegelserne.

Hvor der kraeves en reproduktions (fertilitets) test over tre generationer, kan den beskrevne metode
til reproduktionstest i to generationer (metode B.35) udvides med en tredje generation.

B.V Neurotoksicitet

Neurotoksicitet kan paavises paa forskellige maader, f.eks. funktionelle aendringer og/eller strukturelle biokemiske aendringer i det centrale eller perifere nervesystem. Tests for akut toksicitet kan give et foreloebigt indicium for neurotoksicitet. Toksicitetstesten med gentagen dosis, metode B.7, omfatter vurdering af neurotoksikologiske virkninger; det er vigtigt, at der foretages omhyggelige kliniske observationer af dyrene, saa der udledes mest mulig information heraf. Metoden kan bruges til at identificere kemiske stoffer med neurotoksisk potentiale, som eventuelt boer underkastes yderligere tilbundsgaaende undersoegelser. Derudover er det vigtigt at vaere
opmaerksom paa stoffernes evne til at foraarsage specifikke neurotoksiske effekter, som ikke er paavist
i andre toksicitetsundersoegelser. F.eks. et det paavist, at visse organiske phosphorforbindelser kan
foraarsage forsinket neurotoksicitet; de kan vurderes med metode B.37 og B.38 efter enkelt eller gentagen dosis.

B.VI Immunotoksicitet

Immunotoksicitet kan paavises paa forskellige maader, f.eks. immunosuppression og/eller skaerpelse af
immunsystemets foelsomhed, hvilket fremkalder overfoelsomhed eller induceret autoimmunitet. Toksicitetstesten med gentagen dosis, metode B.7, omfatter vurdering af immunotoksiske effekter.

Denne metode kan bruges til at identificere kemiske stoffer med immunotoksisk potentiale, som eventuelt boer undersoeges yderligere.

B.VII Toksikokinetik

Toksikokinetiske undersoegelser er en hjaelp til fortolkning og vurdering af toksicitetsdata. Formaalet med disse undersoegelser er at belyse saerlige aspekter af den testede kemiske forbindelses
toksiske virkning, og undersoegelsesresultaterne kan vaere til stoette ved udformning af

yderligere
toksikologiske undersoegelser. Det er ikke hensigten med disse undersoegelser i alle tilfaelde at bestemme alle parametre. Kun i sjaeldne tilfaelde vil det vaere noedvendigt at gennemfoere hele raekken
af toksikokinetiske undersoegelser (absorption, udskillelse, distribution og stofskifte). For en raekke kemiske forbindelsers vedkommende kan det vaere tilraadeligt at aendre denne raekkefoelge, og det
vil i nogle tilfaelde vaere tilstraekkeligt at teste en enkelt dosis (metode B.36).
Oplysninger om den kemiske struktur og de fysisk-kemiske egenskaber kan ogsaa indicere, hvorledes
absorptionen kan foregaa, naar der vaelges en bestemt fremgangsmaade at administrere stoffet paa, og de
kan give oplysning om stoffets skaebne i stofskifteprocesser og fordeling i vaev. Der kan ogsaa foreligge oplysninger om toksikokinetiske parametre fra tidligere undersoegelser af toksicitet og toksikokinetik.

C. BESKRIVELSE AF TESTSTOFFET

Teststoffets sammensaetning, herunder de vigtigste urenheder, og dets relevante fysisk-kemiske egenskaber, herunder dets stabilitet, skal vaere kendt forud for enhver undersoegelse af toksicitet.
Teststoffets fysisk-kemiske egenskaber giver en raekke vigtige oplysninger for valget af administrationsmaade, udformningen af hver enkelt undersoegelse samt haandtering og opbevaring af
teststoffet.
Forud for undersoegelsen boer der udvikles en analysemetode til kvalitativ og kvantitativ bestemmelse
af stoffet (herunder vigtige urenheder, saafremt dette er muligt) i doseringsmediet og i det biologiske materiale.
Alle oplysninger om teststoffets identitet, fysisk-kemiske egenskaber, renhed og adfaerd medtages i
testrapporten.

D. PASNING AF DYR

Ved toksicitetstests er det afgoerende, at der foeres noeje kontrol med testmiljoeet, og at dyrene passes korrekt.

i) Miljoe

Miljoeet i forsoegsstalde og -bure skal afpasses efter dyrearten. For rotter, mus og marsvin er en rumtemperatur paa 22 ± 3° C og en relativ luftfugtighed paa 30-70 % passende; for kaniner boer temperaturen vaere paa 20 ± 3° C og den relative luftfugtighed paa 30-70 %.
Nogle forsoegsteknikker er saerlig foelsomme over for temperaturafvigelser, og i saadanne tilfaelde
indeholder beskrivelsen af testmetoden naermere oplysninger om passende forsoegsbetingelser. Ved alle
undersoegelser af toksiske virkninger skal temperaturen og luftfugtigheden kontrolleres, registreres
og anfoeres i den afsluttende forsoegsrapport.
Der boer anvendes kunstig belysning, som foelger en rytme med tolv timers lys og tolv timers moerke.
Oplysninger om belysningsrytmen registreres og anfoeres i den afsluttende forsoegsrapport.
Medmindre andet er angivet i metoden, kan dyrene opbevares i bure hver for sig eller i smaa grupper
af samme koen, dog hoejst fem dyr pr. bur.
I rapporter over dyreforsoeg er det vigtigt at anfoere, hvilken type bure der er anvendt, og hvor

mange dyr der har vaeret i hvert bur, saavel under eksponering for det kemiske stof som i en efterfoelgende observationsperiode.
ii) Fodring
Foderet skal opfylde alle de ernaeringskrav, som den paagaeldende art af forsoegsdyr stiller. Hvis
teststofferne indgives med foder, kan reaktioner mellem teststoffet og foderbestanddele medfoere, at
naeringsvaerdien nedsaettes. Muligheden af en saadan reaktion skal tages i betragtning, naar forsoegsresultaterne fortolkes. Der kan anvendes normalt laboratoriefoder med ubegraenset forsyning
af drikkevand. Valget af foder kan afhaenge af, at teststoffet skal kunne iblandes foderet paa passende maade, hvis teststoffet indgives med foderet.
Forureninger i foderet, som vides at influere paa toksiciteten, maa ikke forefindes i interfererende
koncentrationer.
E. HENSYN VED ANVENDELSE AF FORSOEGSDYR
Ved udarbejdelse af testmetoderne er der taget skyldigt hensyn til dyrenes velfaerd. I det foelgende
er der givet nogle faa eksempler; listen er altsaa ikke udtoemmende. Den noejagtige ordlyd og/eller de
noejagtige betingelser fremgaar af de enkelte metoder:
- Til vurdering af akut toksicitet ved oral indgift boer to alternative metoder overvejes, nemlig »fastdosis-metoden« og »metoden til klassificering som akut toksisk«. Fastdosismetoden har ikke
doedsfald som specifikt endepunkt. Metoden til klassificering som akut toksisk anvender gennemsnitligt 70 % faerre forsoegsdyr end metode B.1 for akut oral toksicitet. Begge metoder resulterer i mindre smerte og lidelse end den klassiske metode.
- Antallet af forsoegsdyr reduceres til et videnskabeligt acceptabelt minimum, idet kun fem dyr af
samme koen testes for hvert dosisniveau i forbindelse med metoderne B.1 og B.3; ti dyr (og kun fem
til den negative kontrolgruppe) anvendes til bestemmelse af hudsensibilisering ved hjaelp af maksimeringstest paa marsvin (guinea pig maximumzation test) (metode B.6); antallet af forsoegsdyr
til den positive kontrol i forbindelse med in vivo-testning af mutagenicitet reduceres ligeledes (metode B.11 og B.12).
- Dyrenes smerter og lidelser under forsoegene reduceres, idet dyr, der udviser alvorlige og vedvarende tegn paa lidelse og smerte aflives humant; dosering af teststoffer paa en maade, som vides
at foraarsage smerte og lidelse paa grund af stoffernes aetsende eller lokalirriterende egenskaber, kan udelades (metode B.1, B.2 og B.3).
- Forsoeg med alt for hoeje doser undgaas ved indfoerelse af graensetests, ikke blot i forsoeg for akut
toksicitet (metode B.1, B.2 og B.3), men ligeledes in vivo-forsoeg for mutagenicitet (metode B.11 og
B.12).
- En strategi for testning for irriterende egenskaber goer det nu muligt at undgaa forsoeg, eller forsoeget kan reduceres til undersoegelse af et enkelt dyr, naar der foreligger tilstraekkelig videnskabelig dokumentation.
En saadan videnskabelig dokumentation kan baseres paa stoffets fysisk-kemiske egenskaber, resultaterne af andre tidligere udfoerte tests eller resultaterne af velvaliderede in vitro tests.

Hvis der f.eks. er gennemfoert en undersoegelse af akut dermal toksicitet med graensetestdosis af stoffet (metode B.3), hvor der ikke er iagttaget hudirritation, kan yderligere testning for hudirritation (metode B.4) vaere unoedvendig; materialer, som har udvist klart aetsende eller alvorlige hudirriterende egenskaber i en undersoegelse for hudirritation (metode B.4), boer ikke undersoeges for oejenirritation (metode B.5).

F. ALTERNATIV TESTNING

Den Europaeiske Union har sat sig som maal at udvikle og validere alternative metoder, som kan give
oplysninger paa samme niveau som de nuvaerende dyreforsoeg, men som anvender faerre dyr, foraarsager
mindre smerte, eller hvor brugen af dyr fuldstaendig kan undgaas.

Efterhaanden som saadanne metoder udvikles, skal de saa vidt muligt tages i anvendelse i forbindelse
med risikobeskrivelse og efterfoelgende klassifikation og etikettering baseret paa den potentielle fare ved de paagaeldende stoffer.

G. VURDERING OG FORTOLKNING

Ved vurdering og fortolkning af resultaterne af dyreforsoeg og in vitro-undersoegelser skal der tages
hensyn til, at der er graenser for, i hvilket omfang de kan ekstrapoleres direkte til mennesker; dokumentation for skadelige virkninger paa mennesker, hvor saadan foreligger, skal derfor anvendes
til at bekraefte testresultaterne.

Testresultaterne kan anvendes til klassificering og etikettering af nye og eksisterende kemiske stoffer med hensyn til disses sundhedsvirkninger for mennesker paa grundlag af deres iboende egenskaber, som paavist og kvantificeret med disse metoder. De tilsvarende kriterier for klassificering og etikettering i bilag VI er ogsaa baseret paa endepunkterne i forsoegsprotokollerne
for disse testmetoder.

Disse resultater kan ogsaa anvendes til risikovurderingsundersoegelser af nye og eksisterende stoffer, og passende undersoegelsesstrategier til disse formaal er anfoert i de tilsvarende vejledninger.

H. LITTERATURHENVISNINGER

De fleste af disse metoder er udviklet inden for rammerne af OECD's program for retningslinjer for
forsoegsvirksomhed (OECD-Test Guidelines) og boer udfoeres i overensstemmelse med principperne for god
laboratoriepraksis, saa der kan opnaas stoerst mulig »gensidig accept af data«.

Yderligere oplysninger kan findes i henvisningerne i OECD-retningslinjerne og relevant litteratur,
der er offentliggjort andetsteds.

B.1 ter

AKUT TOKSICITET (ORAL INDGIFT) — METODE TIL KLASSIFICERING SOM AKUT TOKSISK

1. METODE

1.1. Indledning

Denne metode giver oplysninger til brug for både risikovurdering og -klassificering.

I metoden anvendes tre faste doser på forskellige niveauer, der tillader, at et stof kan klassificeres på grundlag af undersøgelsesresultaterne. Endvidere giver proceduren i denne testmetode mulighed for at vælge tre supplerende faste doser, som enten kan anvendes som alternative muligheder ved visse beslutningspunkter eller til yderligere testning. Anvendelse af supplerende dose(r) kan overvejes, hvis en mere tilbundsgående analyse er ønskelig eller nødvendig.

Der anvendes faste udgangsdoser. Metoden tager ikke sigte på beregning af en nøjagtig LD_{50}, men giver mulighed for bestemmelse af et eksponeringsinterval, inden for hvilket dødelighed kan forventes, eftersom dødelig udgang for en del af dyrene stadig er det vigtigste endepunkt for denne test. Resultaterne af testen bør kunne anvendes til klassificering i henhold til kriterierne i bilag VI. Da denne fremgangsmåde er sekventiel, kan testens varighed være længere end den under B.1 beskrevne procedure. Den vigtigste fordel ved denne metode er, at den kræver færre dyr end både metoden for akut toksicitet (oral indgift) (B.1) og den alternative fastdosismetode (B.1.bis).

Se også den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Testmetodens princip

Stoffet indgives oralt til en gruppe forsøgsdyr på et af de fastsatte dosisniveauer. Stoffet afprøves med en trinvis fremgangsmåde, hvor der på hvert trin anvendes tre dyr af samme køn. Det er ikke nødvendigt at gennemføre en indledende observationsundersøgelse. Det næste trin afhænger af, om der indtræffer stofrelateret dødelighed blandt de behandlede dyr:

— der behøves ingen yderligere testning

— næste trin udføres med samme dosis, men med dyr af det andet køn

— næste trin udføres på det umiddelbart højere eller lavere dosisniveau.

1.4. Beskrivelse af testmetoden

1.4.1. *Forberedelser*

Unge, sunde, kønsmodne dyr udvælges vilkårligt, mærkes med henblik på individuel identifikation og holdes i deres bure i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes, så dyrene kan tilpasse sig laboratoriebetingelserne. Dyrene kan anbringes sammen i bure efter køn og dosisniveau, men antallet af dyr pr. bur må ikke forringe muligheden for at foretage klare observationer af hvert enkelt dyr.

Teststoffet indgives dyrene i en enkelt dosis med mavesonde eller passende intubationsrør.

Om nødvendigt opløses eller opslæmmes teststoffet i et passende vehikel. Det anbefales, at der så vidt muligt anvendes en vandig opløsning/opslæmning og, hvis dette ikke er muligt, en opløsning/emulsion i olie (f.eks. majsolie) eller eventuelt en opløsning i andre vehikler. Ikke-vandige vehiklers toksiske egenskaber skal være kendt eller bestemmes forud for testen.

Dyrene fastes, inden teststoffet indgives (f.eks. natten over for rotter eller tre til fire timer for mus); der skal være fri adgang til drikkevand.

1.4.2. *Forsøgsbetingelser*

1.4.2.1. Forsøgsdyr

Rotter er de fortrukne forsøgsdyr, medmindre der foreligger kontraindikationer. Hundyr må ikke have født og må ikke være drægtige.

For såvel han- som hunrotter gælder det, at vægten af de anvendte dyr ikke må variere med mere end ± 20 % fra en rimelig gennemsnitsvægt ved forsøgets begyndelse.

1.4.2.2. Antal og køn

Der anvendes tre dyr af samme køn på hvert trin. Begge køn kan bruges på det første trin.

1.4.2.3. Dosisniveauer

Som udgangsdosis vælges et af følgende tre faste niveauer, 25, 200 og 2 000 mg/kg legemsvægt. Udgangsdosisniveauet bør være det niveau, som med størst sandsynlighed kan ventes at medføre dødelighed for i hvert fald nogle af de behandlede dyr. Afhængigt af udgangsdosis kan et af diagrammerne i bilag 1 anvendes.

Ved valg af køn og udgangsdosis bør alle foreliggende oplysninger anvendes, herunder oplysninger om struktur/aktivitetsforhold. Hvis det af oplysningerne kan sluttes, at der ikke er sandsynlighed for dødelighed ved det højeste dosisniveau (2 000 mg/kg legemsvægt), bør der gennemføres en grænsetest. Hvis der ikke foreligger oplysninger om teststoffet, anbefales det af hensyn til dyrenes velfærd at anvende en udgangsdosis på 200 mg/kg legemsvægt.

Der kan til tider være brug for mere nøjagtige oplysninger, end der kan opnås efter testen med de tre faste dosisniveauer på 25, 200 og 2 000 mg/kg legemsvægt. I så fald kan det overvejes at gennemføre yderligere testning med supplerende fastdosisniveauer på 5, 50 eller 500 mg/kg legemsvægt.

Doser, der vides at forårsage udtalt smerte eller lidelse på grund af ætsende eller stærkt lokalirriterende egenskaber, er overflødige.

Tidsrummet mellem behandling af de forskellige grupper afhænger af tidspunktet for, varigheden af og styrken af tegnene på toksicitet. Behandling af dyr af det andet køn eller behandling med den næste dosis bør udsættes, indtil der er sikkerhed for, at de tidligere behandlede dyr overlever.

1.4.2.4. Grænsetest

Der kan udføres en grænsetest med en dosis på 2 000 mg/kg legemsvægt med tre dyr af hvert køn. Optræder der teststofrelaterede dødsfald, kan det være nødvendigt at gennemføre en yderligere undersøgelse med en dosis på 200 mg/kg (eller 500 mg/kg) legemsvægt.

1.4.2.5. Observationsperiode

Dyrene skal normalt observeres i 14 dage, medmindre der indtræder dødsfald eller det af hensyn til dyrene er nødvendigt at fjerne dem fra undersøgelsen og aflive dem humant. Observationsperiodens varighed bør dog ikke fastsættes rigoristisk. Den bør bestemmes ud fra de toksiske reaktioner, tidspunktet for disses indtræden og restitutionsperiodens længde; den kan således forlænges, hvis det anses for nødvendigt. Tidspunktet for, hvornår symptomer på toksicitet erkendes og forsvinder, er vigtigt, navnlig hvis der er tendens til, at tegnene på toksicitet indtræder sent. Alle observationer registreres systematisk for hvert enkelt dyr.

1.4.3. *Fremgangsmåde*

Efter fasteperioden vejes dyrene forud for indgift af teststoffet. Når teststoffet er indgivet, kan man undlade at give dyrene foder i yderligere tre til fire timer. Hvis en dosis indgives fraktioneret over en periode, kan det være nødvendigt at give dyrene foder og vand afhængigt af, hvor lang en periode der er tale om.

Den største væskevolumen, som kan indgives på én gang, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Hos gnavere bør volumen normalt ikke overstige 1 ml/100 g legemsvægt; for vandige opløsninger kan 2 ml/100 g legemsvægt imidlertid komme i betragtning. Volumenvariationer minimeres ved at justere koncentrationen for at sikre en konstant volumen ved alle dosisniveauer. Hvis én enkelt dosis ikke er mulig, kan dosis gives i mindre fraktioner over en periode på højst 24 timer.

Testproceduren er beskrevet indgående i bilag 1.

1.4.3.1. *Generelle observationer*

Der foretages grundige kliniske observationer mindst to gange den dag, hvor teststoffet indgives, eller hyppigere, hvis dyrenes reaktion på behandlingen indicerer dette, og mindst en gang om dagen derefter. Døende dyr og dyr, der viser tegn på alvorlig smerte og lidelse, aflives humant. Dyr, der aflives af humane grunde, behandles på samme måde som dyr, der er døde under forsøget.

Hvis dyr aflives af humane årsager eller findes døde, registreres dødstidspunktet så nøjagtigt som muligt. Der kræves supplerende observationer, hvis dyrene fortsat udviser tegn på toksicitet. Observationerne skal omfatte forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, derudover åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønster. Der foretages en omhyggelig observation for forekomst af rystelser, kramper, spytflod, diarré, aparti, søvn og bevidstløshed.

Alle observationer registreres systematisk for hvert enkelt dyr.

1.4.3.2. *Legemsvægt*

Alle dyrene vejes, kort tid inden teststoffet indgives, og dernæst mindst én gang om ugen. Vægtforandringer beregnes og registreres. Ved testens afslutning vejes overlevende dyr, inden de aflives humant.

1.4.3.3. *Makroskopisk undersøgelse*

Alle forsøgsdyrene, herunder de dyr, der dør under forsøget, eller som fjernes fra undersøgelsen, underkastes makroskopisk undersøgelse. Alle makroskopisk patologiske forandringer registreres for hvert dyr. Der kan også foretages en mikroskopisk undersøgelse af organer, der udviser tegn på makroskopisk patologi, på dyr, der overlever mindst 24 timer, da en sådan undersøgelse kan give nyttige oplysninger.

2. DATA

Der registreres data for hvert enkelt dyr. Derudover opstilles alle data i tabelform, som for hver testgruppe viser: antal dyr, der er anvendt; antal dyr, der udviser tegn på toksicitet; antal dyr, som findes døde under forsøget, eller som aflives af humane årsager; dødstidspunktet for de enkelte dyr; en beskrivelse af og tidsforløbet for de toksiske virkninger og reversibilitet samt obduktionsfund.

Bilag 2 indeholder generelle retningslinjer for fortolkning af resultaterne med henblik på klassificering.

3. RAPPORTERING

Forsøgsrapport

Forsøgsrappporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

Forsøgsdyr:

— art/stamme

— dyrenes mikrobiologiske status, hvis denne kendes

— dyrenes antal, alder og køn

— herkomst, laboratoriemiljø, foder osv.

— hvert enkelt dyrs vægt ved forsøgets begyndelse, herefter med ugentlige mellemrum og ved forsøgets afslutning.

Forsøgsbetingelser:

— begrundelse for valg af vehikel, medmindre det er vand

— nærmere oplysninger om indgift af teststoffet, herunder dosisvolumen og doseringstidspunkt

— oplysninger om foder- og vandkvalitet (herunder type/oprindelse, vandets oprindelse)

— begrundelse for valg af udgangsdosis.

Resultater:

— tabelopstilling over reaktioner efter køn og dosisniveau for hvert enkelt dyr (dvs. dyr, som har vist tegn på toksicitet, herunder død, virkningernes art, sværhedsgrad og varighed)

— tidspunkt og tidsforløb for tegn på toksicitet og disses reversibilitet, for hvert enkelte dyr

— obduktionsfund og eventuelle histopatologiske fund for hvert enkelt dyr.

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. LITTERATURHENVISNINGER

Denne metode svarer til TG 423 fra OECD.

BILAG 1

FORSØGSPROCEDURE

1. Som angivet under punkt 1.4.2.3, bør udgangsdosis være den dosis, som forventes at medføre dødelighed for i hvert fald nogle af de doserede dyr. Oplysninger, der kan anvendes ved valg af udgangsdosis:
   — data om fysisk-kemiske egenskaber
   — struktur/aktivitetsforhold
   — alle data fra andre toksicitetstests
   — forventet brug af teststoffet.

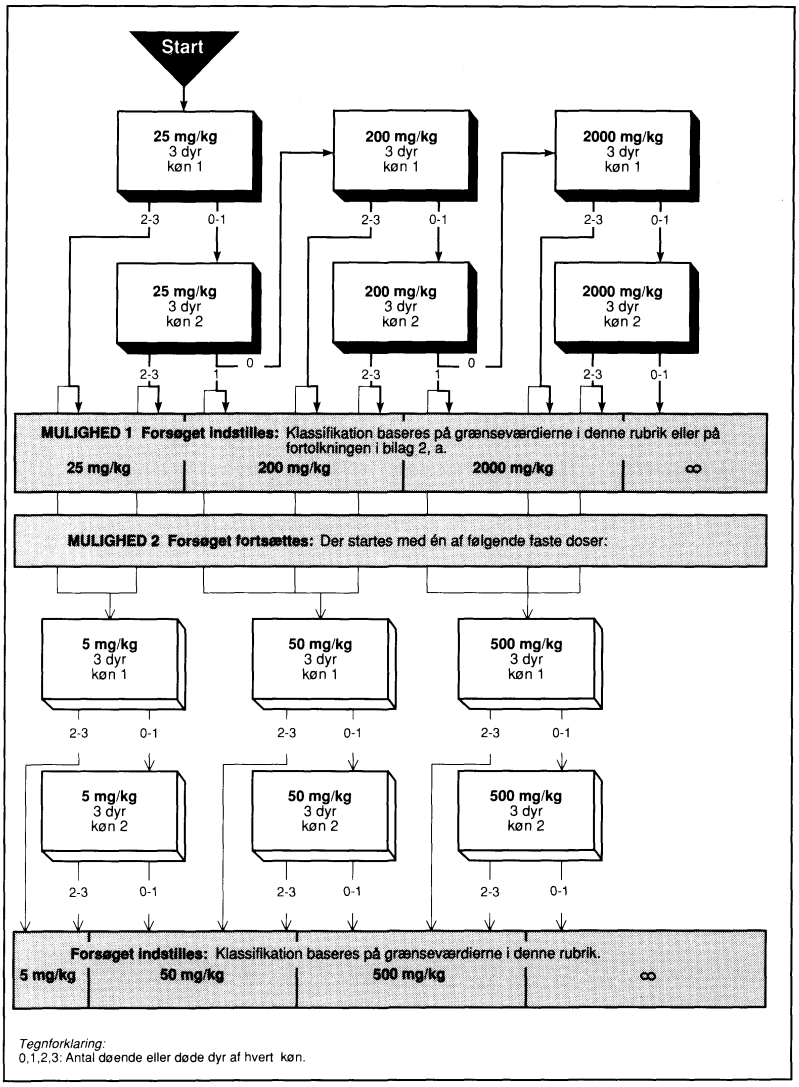
2. For hver udgangsdosis angives fremgangsmåden i de respektive forsøgsdiagrammer, der er anført i dette bilag. Arbejdsgangen er anført med pile og afhænger af antallet af humant aflivede dyr eller døde dyr.

3. Hvis kun ét dyr af det andet køn dør ved en udgangsdosis på 25 eller 200 mg/kg legemsvægt, foretages der normalt ikke yderligere testning. Hvis der imidlertid ikke observeres tegn på toksicitet hos de andre fem dyr, bør der under obduktion tages hensyn til muligheden for, at dødeligheden ikke er stofrelateret. I dette tilfælde bør testen videreføres med dosis på det efterfølgende højere niveau.

4. Hvis ét dyr af hvert køn dør ved en dosis på 2 000 mg/kg legemsvægt, kan LD_{50}-værdien formodes at være højere end 2 000 mg/kg legemsvægt. Da dette imidlertid er et grænseresultat, bør reaktionen fra de resterende to dyr af hvert køn observeres nøje, og forekommer der distinkte og klare tegn på toksicitet hos disse dyr, kan det medføre klassificering af stoffet svarende til en LD_{50}-værdi på 2 000 mg/kg legemsvægt eller mindre eller begrunde yderligere testning på samme niveau.

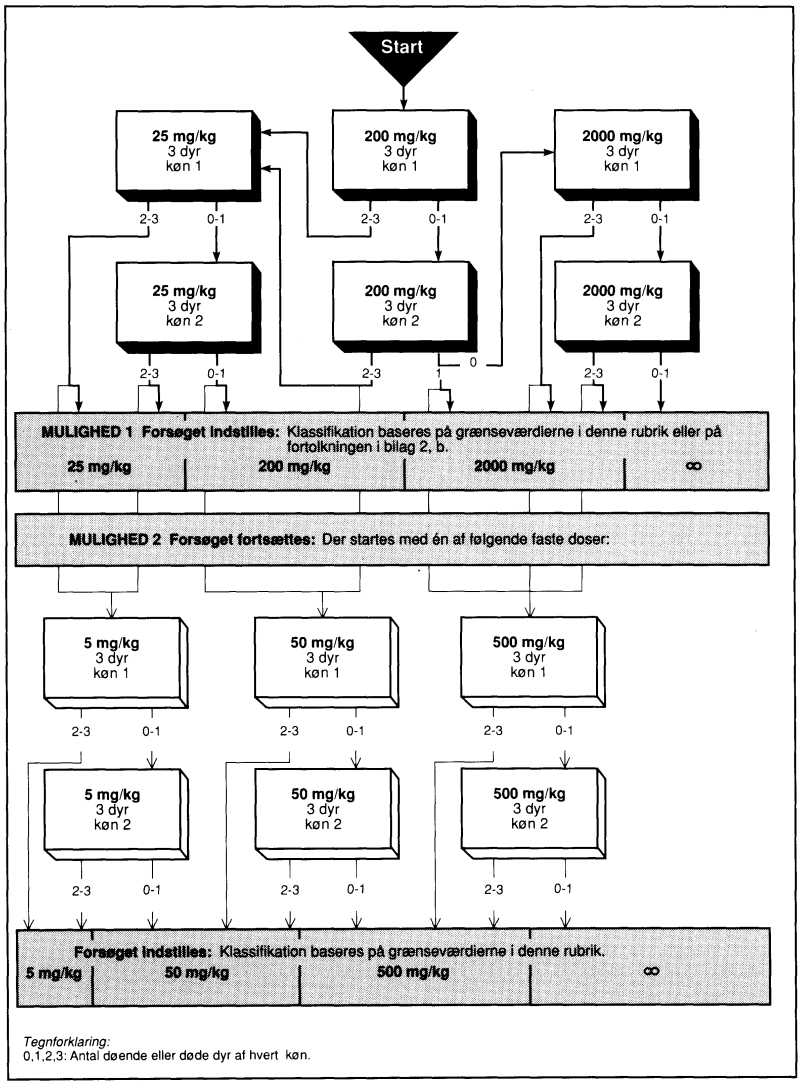
5. Fremgangsmåden giver mulighed for testning med yderligere tre faste doser (mulighed 2). Denne mulighed kan enten anvendes til at vælge en alternativ dosis på et givet beslutningspunkt eller til yderligere testning efter afslutning af den igangværende test (mulighed 1). Mulighed 1-fremgangsmåden er angivet med kraftigt markerede pile, mens mulighed 2-fremgangsmåden er angivet med tynde pile.

a) Forsøgsprocedure med udgangsdosis på 25 mg/kg legemsvægt



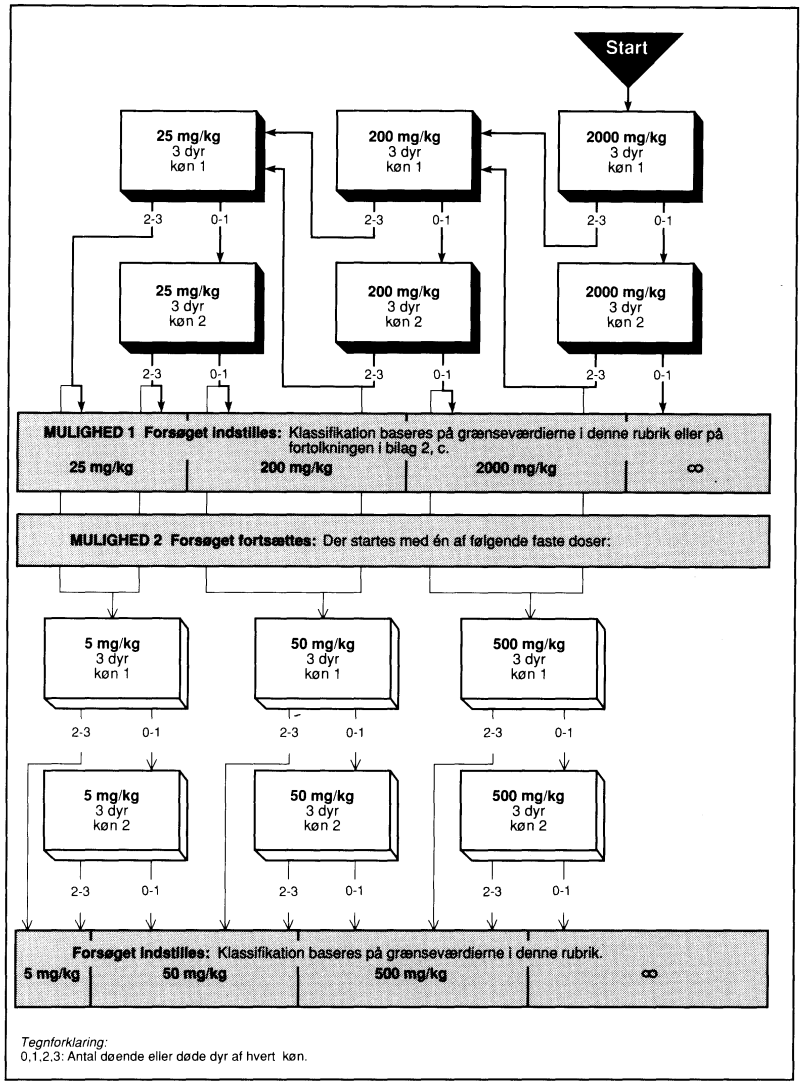
Tegnforklaring:
0,1,2,3: Antal døende eller døde dyr af hvert køn.

b) **Fremgangsmåde med udgangsdosis på 200 mg/kg legemsvægt**



Tegnforklaring:
0,1,2,3: Antal døende eller døde dyr af hvert køn.

c) **Forsøgsprocedure med udgangsdosis på 2 000 mg/kg legemsvægt**



Tegnforklaring:
0,1,2,3: Antal døende eller døde dyr af hvert køn.

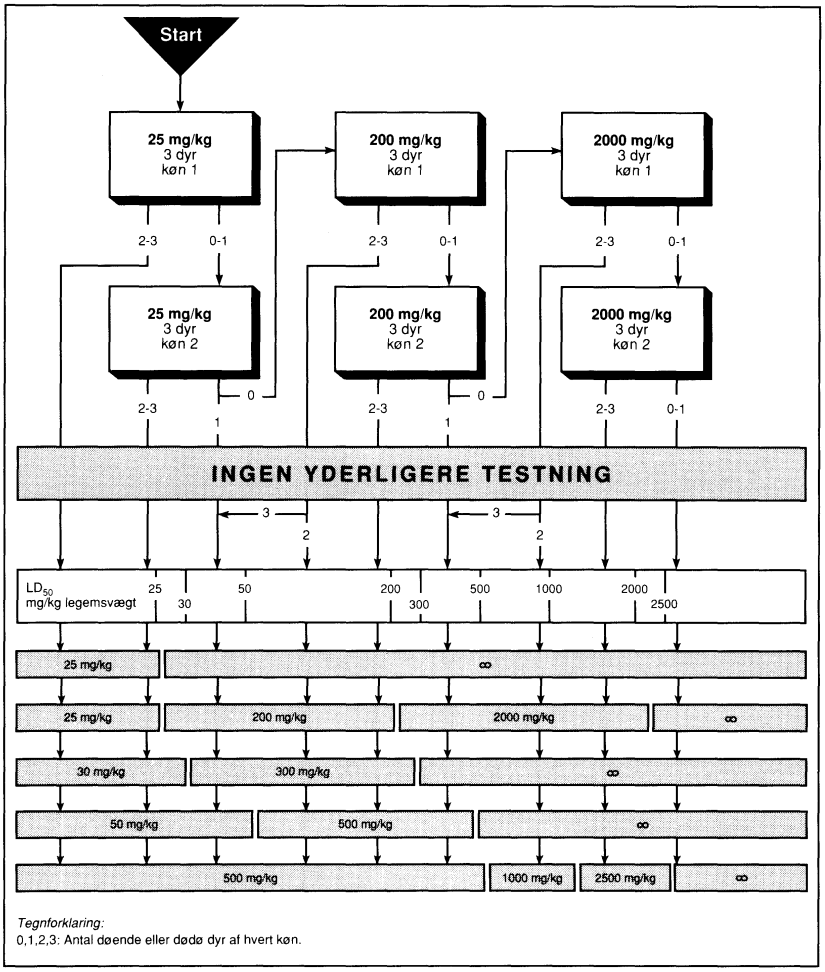
BILAG 2

FORTOLKNING AF RESULTATERNE BASERET PÅ MULIGHED 1-TESTNING

De grå rubrikker »ingen yderligere testning« i diagrammerne i dette bilag viser de grænseværdier, der tjener til klassifikation. Efter forsøgsproceduren i mulighed 1 følges den relevante pil indtil den relevante grå rubrik.

a) **Fortolkning af resultaterne baseret på mulighed 1-testning**

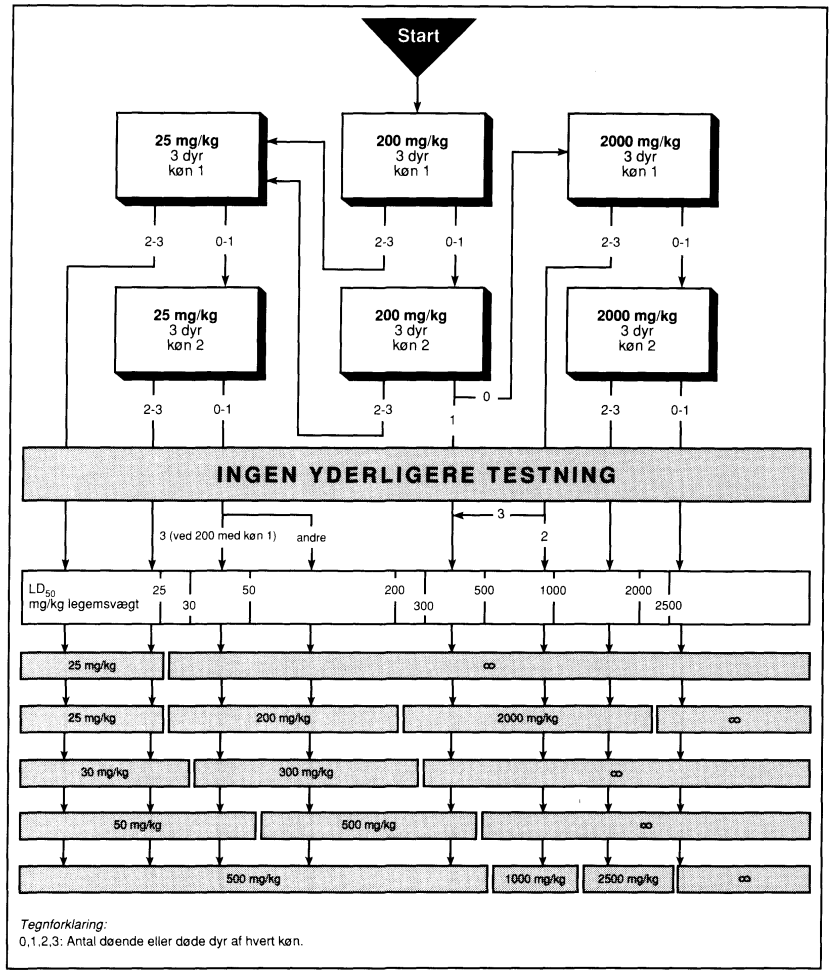
Udgangsdosis: 25 mg/kg legemsvægt



Tegnforklaring:
0,1,2,3: Antal døende eller dødø dyr af hvert køn.

b) **Fortolkning af resultaterne baseret på mulighed 1-testning**

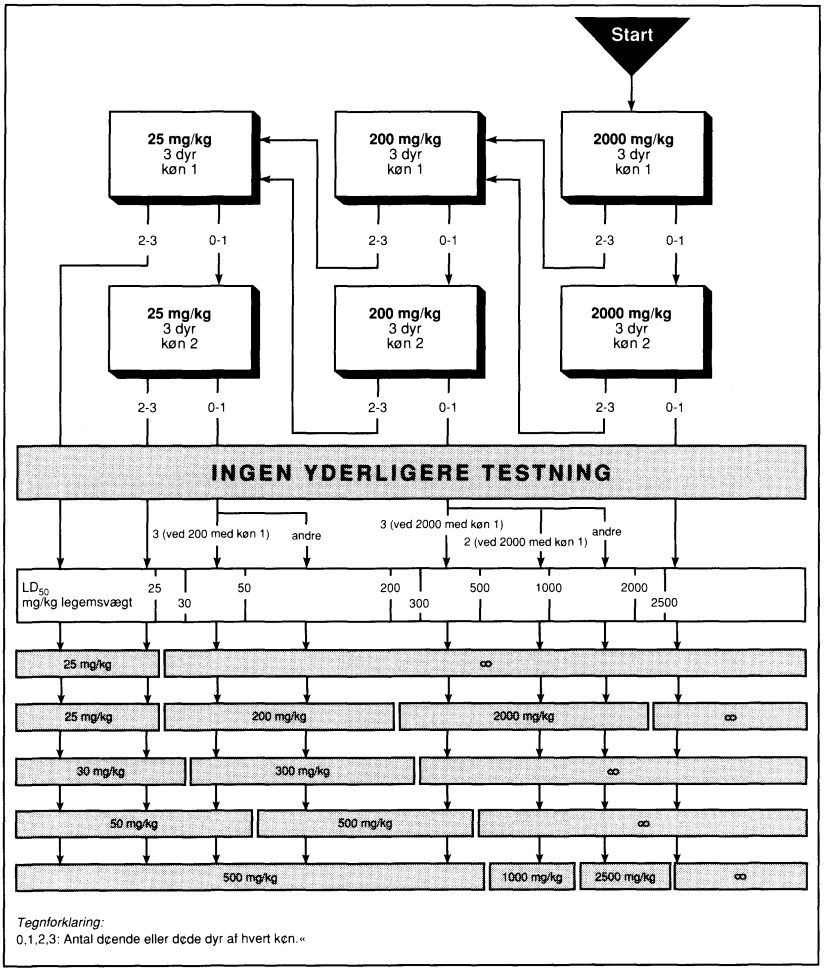
Udgangsdosis: 200 mg/kg legemsvægt



Tegnforklaring:
0,1,2,3: Antal døende eller døde dyr af hvert køn.

c) **Fortolkning af resultaterne baseret på mulighed 1-testning**

Udgangsdosis: 2 000 mg/kg legemsvægt



Tegnforklaring:
0,1,2,3: Antal dœende eller dœde dyr af hvert kœn.«

B.2. AKUT TOKSICITET (INHALATION)

1. METODE

1.1. INDLEDNING
Det er nyttigt at have forhaandsoplysninger om stoffets partikelstoerrelsesfordeling, damptryk, smeltepunkt, kogepunkt, flammepunkt og eventuelle eksplosive egenskaber.
Se ogsaa den generelle indledning til afsnit B (punkt A).

1.2. DEFINITIONER
Se den generelle indledning til afsnit B (punkt B).

1.3. REFERENCESTOFFER
Ingen.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP
Flere grupper forsoegsdyr udsaettes i en angivet periode for teststoffet i graduerede koncentrationer, idet der anvendes en bestemt koncentration til hver enkelt gruppe. Der foretages observationer af virkningerne, herunder doed. Dyr, der doer under forsoeget, obduceres. Ved slutningen af forsoeget aflives og obduceres overlevende dyr.
Det kan vaere noedvendigt, at dyr, der viser vedvarende symptomer paa staerk smerte eller lidelse, aflives paa human maade. Undersoegelse af stoffer paa en maade, som paa grund af deres aetsende eller lokalirriterende egenskaber vides at volde betydelig smerte og lidelse, er ikke paakraevet.

1.5. KVALITETSKRITERIER
Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. Forberedelser
Dyrene holdes under forsoegsbetingelser med hensyn til miljoe og fodring i mindst fem dage, inden forsoeget paabegyndes. Unge, sunde, koensmodne rotter fordeles randomiseret i det noedvendige antal grupper, inden forsoeget saettes i gang. De behoever ikke udsaettes for simuleret eksponering, medmindre dette indiceres af den type eksponeringsudstyr, der anvendes. Det kan vaere noedvendigt at mikronisere faste teststoffer for at opnaa en passende partikelstoerrelse.
Om noedvendigt kan der tilsaettes et egnet vehikel til teststoffet, saaledes at der opnaas en passende koncentration af teststoffet i luften. I saa tilfaelde skal der i forsoeget indgaa en kontrolgruppe, der udsaettes for vehiklet. Hvis der anvendes et vehikel eller andre tilsaetningsstoffer for at lette doseringen, skal det vaere paavist, at de ikke har nogen toksisk virkning. Her kan tidligere data benyttes.

1.6.2. Forsoegsbetingelser

1.6.2.1. Forsoegsdyr
Rotter er de foretrukne forsoegsdyr, medmindre der foreligger kontraindikationer. Der benyttes rotter af almindeligt anvendte stammer. For saavel han- som hunrotter gaelder det, at vaegten af de anvendte dyr ikke maa variere mere end ± 20 % fra en rimelig gennemsnitsvaegt ved forsoegets begyndelse.

1.6.2.2. Antal og koen
Der anvendes mindst 10 gnavere (fem hunner og fem hanner) til hvert koncentrationsniveau af stoffet. Hunnerne maa ikke have foedt og maa ikke vaere draegtige.
Bemaerk: Ved anvendelse af hoejere dyr end gnavere til undersoegelse af akut toksicitet skal det overvejes, om antallet af dyr kan nedsaettes. Doserne skal fastlaegges med omhu, og man skal bestraebe sig paa ikke at benytte hoejere doser end moderat toksiske doser. I saadanne undersoegelser boer indgift af doedelige doser af teststoffet undgaas.

1.6.2.3. Eksponeringskoncentrationer
Der anvendes et tilstraekkeligt antal dosisniveauer, mindst tre, og disse skal vaere valgt saaledes, at der opnaas en graduering af de toksiske virkninger og doedeligheden i testgrupperne. Der skal vaere tilstraekkelige data til, at der kan optegnes en dosis-virkningskurve og om muligt foretages en rimelig bestemmelse af LC50.

1.6.2.4. Graensetest
Hvis en eksposition af fem han- og fem hundyr paa 20 mg/l af et stof paa gasform eller 5 mg/l af en aerosol eller et fint fordelt stof i fire timer, eller - hvis dette ikke kan lade sig goere som foelge af fysiske eller kemiske egenskaber (herunder eksplosive) ved teststoffet - den hoejest opnaaelige koncentration ikke har teststofrelateret doedelig virkning inden for 14 dage, kan yderligere forsoeg betragtes som overfloedige.

1.6.2.5. Eksponeringstid
Eksponeringsperioden er fire timer.

1.6.2.6. Udstyr
Dyrene testes med inhalationsudstyr, der er udformet saaledes, at der kan opretholdes en dynamisk luftcirkulation med et luftskifte paa mindst 12 gange pr. time samtidig med et tilstraekkeligt iltindhold og jaevn fordeling af eksponeringsluften. Benyttes der eksponeringskammer, skal det vaere saaledes indrettet, at forsoegsdyrene sammenklumpes mindst muligt og eksponeres mest muligt for teststoffet ved inhalation. Den generelle regel for sikkerhed for stabil atmosfaere er, at dyrenes totale »volumen« ikke maa overstige 5 % af eksponeringskammerets volumen. Eksponeringen kan foregaa gennem mund-naese, hovedet alene eller ved kamre til hele kroppen; ved anvendelse af de to foerste muligheder opnaar man, at optagelsen af teststoffet ad andre veje minimeres.

1.6.2.7. Observationsperiode
Observationsperioden skal vaere mindst 14 dage. Observationsperiodens varighed boer dog ikke fastsaettes rigoristisk, men bestemmes ud fra de toksiske reaktioner, hvornaar disse indtraeder, og restitutionsperiodens laengde; den kan saaledes forlaenges, saafremt det anses for noedvendigt. Tidspunktet for, hvornaar symptomer paa toksicitet erkendes og forsvinder, samt doedstidspunktet er vigtige, navnlig hvis der er tendens til, at der indtraeffer sene doedsfald.

1.6.3. Fremgangsmaade
Kort foer eksponeringen vejes dyrene, hvorefter de udsaettes for testkoncentrationen i det paagaeldende eksponeringsudstyr i fire timer, efter at der er opnaaet ligevaegtskoncentration i kammeret. Ligevaegten skal opnaas hurtigt. Temperaturen holdes under forsoeget paa 22 C ± 3 C. Under ideelle forhold skal den relative luftfugtighed holdes paa mellem 30 % og 70 %, men i visse tilfaelde (f.eks. ved test af visse aerosoler) kan det vaere praktisk uigennemfoerligt. Udsivning af teststof til omgivelserne kan forhindres ved, at der i kammeret holdes et svagt undertryk (≤ 5 mm vandsoejle). Der gives hverken foder eller vand under eksponeringen. Der anvendes passende systemer til generering og kontrol af testatmosfaeren. Systemet skal sikre

stabile eksponeringsforhold saa hurtigt som muligt. Kammeret skal vaere konstrueret og kunne betjenes paa en saadan maade, at testatmosfaeren hele tiden er ensartet fordelt i kammeret.
Der foretages maalinger eller kontrol af
(a) lufthastighed (kontinuerligt)
(b) den faktiske koncentration af teststoffet maalt i opholdsarealet mindst tre gange under eksponeringen (for nogle atmosfaerers vedkommende, f.eks. aerosoler med hoeje koncentrationer, kan hyppigere kontrol vaere paakraevet). Koncentrationen maa under eksponeringsperioden ikke variere mere end ± 15 % fra den gennemsnitlige koncentration. Det kan dog vaere umuligt at opnaa en saadan grad af kontrol med visse aerosoler, og i saa tilfaelde kan stoerre udsving accepteres. For aerosoler skal partikelstoerrelsen analyseres saa ofte, som det er noedvendigt (mindst én gang pr. forsoegsgruppe)
(c) temperatur og luftfugtighed, om muligt kontinuerligt.
Under og efter eksponering foretages der systematiske observationer, som registreres for hvert enkelt dyr. Observationerne skal foretages hyppigt i loebet af den foerste dag. Der skal foretages en grundig klinisk undersoegelse mindst én gang hver arbejdsdag. Herudover boer dyrene dagligt observeres, saa det mindst mulige antal dyr gaar tabt for undersoegelsen, d.v.s. at dyr, der findes doede, obduceres eller nedkoeles, og at svage eller doeende dyr isoleres eller aflives.
Inspektion af dyrene skal omfatte forandringer i hud og pels, oejne og slimhinde, derudover aandedraet og kredsloeb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfaerdsmoensteret. Der boer navnlig foretages en omhyggelig observation af respiration, rystelser, kramper, spytflaad, diarré, apati, soevn og bevidstloeshed. Doedstidspunktet noteres med stoerst mulig noejagtighed. Forsoegsdyrenes individuelle vaegt bestemmes ugentligt og paa doedstidspunktet.
De dyr, der doer under forsoeget, og de, der overlever til forsoegets afslutning, obduceres med saerlig opmaerksomhed rettet mod eventuelle aendringer i de oevre og nedre luftveje. Alle makroskopisk patologiske forandringer registreres. Paa indikation udtages der vaevsproever til histopatologisk undersoegelse.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsoeget, doedstidspunkt for de enkelte dyr, antal dyr, der udviser andre symptomer paa toksicitet, beskrivelse af toksiske virkninger og obduktionsfund. Vaegtaendringer beregnes og registreres for alle dyr, der lever mere end en dag efter eksponeringen. Aflivning af dyr paa human maade paa grund af lidelse og smerte fremkaldt af teststoffet registreres som teststofrelaterede doedsfald. LC50 bestemmes efter en anerkendt metode. Evaluering af data boer omfatte sammenhaeng, hvis en saadan findes, mellem dyrenes eksponering for teststoffet og hyppighed og grad af alle forandringer, herunder adfaerdsmaessige og kliniske symptomer, makroskopisk patologiske forandringer, aendringer i legemsvaegt, doedelighed og eventuelle andre toksiske virkninger.

3. RAPPORTERING

3.1. FORSOEGSRAPPORT

Forsoegsrapporten skal om muligt indeholde foelgende oplysninger
- dyreart/stamme, herkomst, miljoebetingelser, foder o.s.v.
- forsoegsbetingelser

beskrivelse af eksponeringsudstyret, herunder udformning, type, dimensionering, luftkilde, system til frembringelse af aerosoler, metode til konditionering af luften og den maade, hvorpaa dyrene holdes i et eksponeringskammer, naar et saadant benyttes. Apparatur til maaling af temperatur, fugtighed og aerosolers koncentration og partikelstoerrelsesfordeling skal beskrives
Eksponeringsdata

disse skal opstilles i tabelform med angivelse af middelvaerdier og et maal for variationen (standardafvigelser) og i videst muligt omfang omfatte
(a) lufthastigheden gennem inhalationsudstyret
(b) luftens temperatur og fugtighed
(c) nominelle koncentrationer (total maengde teststof tilfoert inhalationsudstyret, divideret med luftvolumen)
(d) type vehikel, hvor et saadant er anvendt
(e) faktiske koncentrationer i opholdsarealet under forsoeget
(f) massemedianen af den aerodynamiske diameter (MMAD) og den geometriske standardafvigelse (GSD)
(g) periode til ligevaegtsindstilling
(h) eksponeringsperiode
- tabelopstilling over reaktioner efter koen og eksponeringsniveau (d.v.s. antal dyr eksponeret; antal dyr, der er doede eller aflivet under forsoeget; antal dyr, der har vist symptomer paa toksicitet)
- doedstidspunktet under eller efter eksponering; begrundelse og kriterier for human aflivning af dyr
- alle observationer
- LC50 for hvert koen bestemt ved afslutningen af observationsperioden (med angivelse af beregningsmetode)
- 95 % konfidensinterval for LC50 (hvor det er muligt)
- dosis/doedelighedskurve og haeldning (hvor beregningsmetoden muliggoer det)
- obduktionsfund
- eventuelle histopatologiske fund
- diskussion af resultaterne (med saerlig opmaerksomhed paa, hvordan human aflivning af dyr under forsoeget kan have indvirket paa den beregnede LC50)
- fortolkning af resultaterne.

3.2. VURDERING OG FORTOLKNING
Se den generelle indledning til afsnit B (punkt D).

4. LITTERATURHENVISNINGER
Se den generelle indledning til afsnit B (punkt E).

B.3. AKUT TOKSICITET (DERMAL)

1. METODE
1.1. INDLEDNING
Se den generelle indledning til afsnit B (punkt A).

1.2. DEFINITIONER
Se den generelle indledning til afsnit B (punkt B).

1.3. REFERENCESTOFFER
Ingen.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP
Teststoffet paafoeres huden paa flere grupper af forsoegsdyr i graduerede doser, idet der anvendes en bestemt dosis til hver enkelt gruppe. Der foretages observationer af virkningerne, herunder doed. Dyr, der doer under forsoeget, obduceres. Ved slutningen af forsoeget aflives og obduceres overlevende dyr.
Det kan vaere noedvendigt, at dyr, der viser vedvarende symptomer paa staerk smerte eller lidelse, aflives paa human maade. Undersoegelse af stoffer paa en maade, som paa grund af deres aetsende eller lokalirriterende egenskaber vides at volde betydelig smerte og lidelse, er ikke paakraevet.

1.5. KVALITETSKRITERIER
Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. Forberedelser
Dyrene holdes under forsoegsbetingelser med hensyn til miljoe og fodring i mindst fem dage, inden forsoeget paabegyndes. Unge, sunde, koensmodne dyr fordeles randomiseret i forsoegsgrupper, inden forsoeget saettes i gang. Ca. 24 timer foer forsoeget paabegyndes, klippes eller barberes dyrene paa ryggen. Under denne procedure maa man passe paa ikke at beskadige huden, da det kan aendre dens permeabilitet. Mindst 10 % af legemets overflade skal goeres klar til paafoering af teststoffet. Ved testning af faste stoffer, som i givet fald kan pulveriseres, skal teststoffet fugtes tilstraekkeligt med vand eller om noedvendigt med et passende vehikel, saa der sikres god kontakt med huden. Hvis der anvendes et vehikel, boer man tage hensyn til, om vehiklet har indflydelse paa hudens permeabilitet for teststoffet. Flydende teststoffer paafoeres normalt ufortyndet.

1.6.2. Forsoegsbetingelser

1.6.2.1. Forsoegsdyr
Der kan anvendes voksne rotter eller kaniner. Der kan anvendes andre dyrearter, men i saa fald skal dette vaere begrundet. Der benyttes dyr af almindeligt anvendte stammer. For begge koen af forsoegsdyr gaelder det, at vaegten af de anvendte dyr ikke maa variere mere end ± 20 % fra en rimelig gennemsnitsvaegt ved forsoegets begyndelse.

1.6.2.2. Antal og koen
Der anvendes mindst 5 dyr (af samme koen) til hvert dosisniveau. Hunnerne maa ikke have foedt og maa ikke vaere draegtige. Foreligger der oplysninger om, at et bestemt koen er vaesentligt mere foelsomt, benyttes der dyr af dette koen.

Bemaerk: Ved anvendelse af hoejere dyr end gnavere til undersoegelse af akut toksicitet skal det overvejes, om antallet af dyr kan nedsaettes. Doserne skal fastlaegges med omhu, og man skal bestraebe sig paa ikke at benytte hoejere doser end moderat toksiske doser. I saadanne undersoegelser boer indgift af doedelige doser af teststoffet undgaas.

1.6.2.3. Dosisniveauer
Der anvendes et tilstraekkeligt antal dosisniveauer, mindst tre, og disse skal vaere valgt saaledes, at der opnaas en graduering af de toksiske virkninger og doedeligheden i testgrupperne. Der boer ved valg af dosis tages hensyn til eventuelle hudirriterende eller aetsende virkninger. Der skal vaere tilstraekkelige data til, at der kan optegnes en dosis-virkningskurve og om muligt foretages en rimelig bestemmelse af LD50.

1.6.2.4. Graensetest
Der kan med en gruppe paa 5 dyr af hvert koen udfoeres en graensetest med en dosis paa mindst 2 000 mg/kg legemsvaegt efter den ovenfor beskrevne procedure. Optraeder der teststofrelaterede doedsfald, kan gennemfoerelse af en fuldstaendig undersoegelse komme i betragtning.

1.6.2.5. Observationsperiode
Observationsperioden skal vaere mindst 14 dage. Observationsperiodens varighed boer dog ikke fastsaettes rigoristisk, men bestemmes ud fra de toksiske reaktioner, hvornaar disse indtraeder, og af restitutionsperiodens laengde; den kan saaledes forlaenges, saafremt det anses for noedvendigt. Tidspunktet for, hvornaar symptomer paa toksicitet erkendes og forsvinder, samt doedstidspunktet er vigtige, navnlig hvis der er tendens til, at der indtraeffer sene doedsfald.

1.6.3. Fremgangsmaade
Dyrene holdes i hver sit bur. Teststoffet paafoeres jaevnt over et omraade, som svarer til ca. 10 % af den samlede legemsoverflade. Med staerkt toksiske stoffer kan der anvendes et mindre omraade, men stoffet boer paafoeres saa tyndt og ensartet og over saa stor en del af omraadet som muligt.
Teststoffet skal holdes i kontakt med huden ved hjaelp af en poroes gazeforbinding og en ikke-hudirriterende klaebestrimmel i en eksponeringsperiode paa 24 timer. Teststedet skal desuden tildaekkes paa en saadan maade, at gazeforbindingen og teststoffet holdes sikkert paa plads, saa at dyrene ikke kan indtage teststoffet. Der kan anvendes andre foranstaltninger, som forhindrer dyrene i at indtage teststoffet; dog kan fuldstaendig immobilisering ikke anbefales.
Ved eksponeringsperiodens afslutning fjernes tilbagesiddende teststof, idet der f.eks. anvendes vand eller et andet egnet middel til at rense huden.
Der foretages systematiske observationer, som registreres for hvert enkelt dyr. Observationerne skal foretages hyppigt i loebet af den foerste dag. Der skal foretages en grundig klinisk undersoegelse mindst én gang hver arbejdsdag. Herudover boer dyrene dagligt observeres, saa det mindst mulige antal dyr gaar tabt for undersoegelsen, d.v.s. at dyr, der findes doede, obduceres eller nedkoeles, og at svage eller doeende dyr isoleres eller aflives.
Inspektionen af dyrene skal omfatte forandringer i pels, behandlet hud, oejne og slimhinder, derudover aandedraet og kredsloeb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet samt adfaerdsmoensteret. Der boer foretages omhyggelig observation af rystelser, kramper, spytflaad, diarré, apati, soevn og bevidstloeshed. Doedstidspunktet skal noteres saa praecist som muligt. De dyr, der doer under forsoeget, og de, der overlever til forsoegets afslutning, obduceres. Alle makroskopisk patologiske forandringer registreres. Paa indikation udtages der vaevsproever til histopatologisk undersoegelse.
Vurdering af toksiciteten hos det modsatte koen
Efter afslutning af undersoegelsen med det ene koen testes en gruppe paa 5 dyr af det modsatte

koen, saa det konstateres, om dyr af dette koen er vaesentligt mere foelsomme over for teststoffet. I enkelte tilfaelde kan anvendelse af faerre dyr vaere velbegrundet. Foreligger der tilstraekkelige oplysninger om, at dyr af det koen, der er testet, er vaesentligt mere foelsomme, er test med dyr af det modsatte koen ikke paakraevet.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsoeget, doedstidspunkt for de enkelte dyr, antal dyr, der udviser andre symptomer paa toksicitet, beskrivelse af toksiske virkninger og obduktionsresultater. Dyrenes individuelle vaegt bestemmes og registreres, kort foer teststoffet paafoeres, derefter ugentligt og endelig paa doedstidspunktet. Vaegtaendringer beregnes og registreres for alle dyr, der lever mere end én dag efter paafoeringen af teststoffet. Aflivning af dyr paa human maade paa grund af lidelse og smerte fremkaldt af teststoffet registreres som teststofrelaterede doedsfald. LD50 bestemmes efter en anerkendt metode.

Evaluering af data boer omfatte sammenhaeng, hvis en saadan findes, mellem dyrenes eksponering for teststof og hyppighed og grad af alle forandringer, herunder adfaerdsmaessige og kliniske symptomer, makroskopisk patologiske forandringer, aendringer i legemsvaegt, doedelighed og eventuelle andre toksiske virkninger.

3. RAPPORTERING

3.1. FORSOEGSRAPPORT

Forsoegsrapporten skal om muligt indeholde foelgende oplysninger

- dyreart/stamme, herkomst, miljoebetingelser, foder o.s.v.
- forsoegsbetingelser (herunder, hvordan huden er renset, og forbindingstypen: med eller uden okklusion)
- dosisniveauer (med angivelse af typen af vehikel, hvor et saadant er anvendt, samt koncentration)
- forsoegsdyrenes koen
- tabelopstilling over reaktioner efter koen og dosis (d.v.s. antal dyr, der er doede eller aflivet under forsoeget; antal dyr, der har vist symptomer paa toksicitet; antal eksponerede dyr)
- doedstidspunktet efter eksponeringen, begrundelse og kriterier for human aflivning af dyr
- alle observationer
- LD50 for det koen, der har vaeret genstand for en fuldstaendig undersoegelse, bestemt efter 14. dag med angivelse af beregningsmetode
- 95 % konfidensinterval for LD50 (hvor det er muligt)
- dosis/doedelighedskurve og haeldning, hvor beregningsmetoden muliggoer det
- obduktionsfund
- eventuelle histopatologiske fund
- resultater af forsoeg med det modsatte koen
- diskussion af resultaterne (med saerlig opmaerksomhed paa, hvordan human aflivning af dyr under forsoeget kan have indvirket paa den beregnede LD50)
- fortolkning af resultaterne.

3.2. VURDERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt D).

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt E).

B. 6

HUDSENSIBILISERING

1. **METODE**

1.1. **Indledning**

Bemærkninger:

I et system for klassifikation af den toksicitet, der er relevant for folkesundheden, er det af stor betydning at have følsomme test, som kan afsløre stoffer, der kan virke hudsensibiliserende på mennesker.

Der findes ikke én enkelt testmetode, hvorved man med sikkerhed kan identificere alle stoffer, som kan virke hudsensibiliserende på mennesker, og som kan anvendes til alle stoffer.

Der skal ved valg af test tages hensyn til en række faktorer såsom stoffets fysiske egenskaber, herunder dets evne til at trænge gennem huden.

Der er udviklet to testtyper med anvendelse af marsvin: adjuvanstypen, hvor en allergisk tilstand forstærkes, når teststoffet opløses eller opslæmmes i Freund's komplette adjuvans (FCA), og typen uden adjuvans.

Test af adjuvanstypen vil normalt forudsige et stofs sandsynlige hudsensibiliserende virkning hos mennesker mere præcist end de metoder, hvor der ikke benyttes Freund's komplette adjuvans, og bliver derfor foretrukket.

Maksimeringstest på marsvin (Guinea-Pig Maximization Test — GPMT) er en meget anvendt test af adjuvanstypen. Skønt en række andre metoder kan benyttes til at undersøge et stofs potentielle hudsensibiliserende virkning, er GPMT den foretrukne metode af adjuvanstypen.

Test uden adjuvans (hvor Buehler-testen er den foretrukne) bliver for mange kemiske stofgrupper anset for at være mindre følsom.

Der kan i visse tilfælde, være gode grunde til at vælge Buehler-testen med lokal påføring i stedet for den intradermale injektion, der benyttes i maksimeringstesten på marsvin. Der skal gives en videnskabelig begrundelse for anvendelse af Buehlertesten.

I denne metode beskrives maksimeringstesten på marsvin (GPMT) og Buehlertesten. Der kan anvendes andre metoder, forudsat at de er tilstrækkeligt validerede, og at valget er videnskabeligt begrundet.

Hvis testresultatet i en af de anerkendte screeningstest er positivt, er det tilladt at betegne stoffet som potentielt sensibiliserende og det er måske ikke nødvendigt at udføre yderligere marsvineforsøg. Hvis stoffet er negativt i en af de anerkendte screeningsmetoder skal der udføres en marsvinetest, hvor der bruges de fremgangsmåder, der er beskrevet i denne testmetode.

Se også den generelle indledning til afsnit B.

1.2. **Definitioner**

Hudsensibilisering: (allergiske kontaktdermatitis) er en immunologisk hudreaktion på et stof. Hos mennesker kan reaktionerne være karakteriseret ved kløen, erytem, ødem, papler, vesikler, blærer eller en kombination heraf. Andre arter kan have andre reaktioner f.eks. kun erytem og ødem.

Induktionseksponering: eksperimentel eksponering af et individ for et teststof med henblik på fremkaldelse af hypersensibel tilstand.

Induktionsperiode: tidsrum på mindst en uge efter en induktionseksponering, under hvilken en hypersensibel tilstand kan være opstået.

Provokationseksponering: eksperimentel eksponering — efter en induktionsperiode — af et tidligere behandlet individ for et teststof til konstatering af, om individet reagerer hypersensibelt.

1.3. **Referencestoffer**

Den anvendte forsøgsmetodes følsomhed og pålidelighed vurderes hver sjette måned med anvendelse af stoffer, der vides at have mildt til moderat hudsensibiliserende egenskaber.

I en velgennemført test bør der for mildt/moderat sensibiliserende stoffer ventes en reaktion på mindst 30 % i en adjuvanstest og mindst 15 % i en test uden adjuvans.

Følgende stoffer foretrækkes:

CAS-nummer	EINECS-nummer	EINECS-navn	Fælles navn
101-86-0	202-983-3	α-hexylkanelaldehyd	α-hexylkanelaldehyd
149-30-4	205-736-8	benzothiazol-2-thiol (mercapto-benzothiazol)	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzocain	norcain

Under visse omstændigheder vil andre kontrolstoffer, der opfylder de ovennævnte kriterier, kunne anvendes, såfremt valget heraf kan begrundes.

1.4. **Testmetodens princip**

Forsøgsdyrene udsættes først for teststoffet med intradermale injektioner og/eller epidermal applikation (induktionseksponering). Efter en hvileperiode på 10-14 dage (induktionsperiode), hvor der kan udvikle sig immunrespons, udsættes dyrene for en provokationsdosis. Omfanget og graden af hudens reaktion på provokationseksponeringen i forsøgsdyrene sammenlignes med resultater fra kontroldyr, der har fået placebo-behandling i induktionsperioden og dernæst er eksponeret for provokationsdosis.

1.5. **Beskrivelse af testmetoderne**

Hvis det anses for nødvendigt at fjerne teststoffet, bør dette gøres med vand eller et passende opløsningsmiddel, uden at den fremkaldte reaktion ændres eller overhuden beskadiges.

1.5.1. *Maksimeringstest på marsvin (Guinea-Pig Maximization Test — GPMT)*

1.5.1.1. Forberedelser

Unge, sunde, kønsmodne albinomarsvin tilvænnes laboratoriebetingelserne i mindst fem dage forud for testen. Før forsøget begyndes, fordeles dyrene randomiseret i behandlingsgrupper. Behåring fjernes ved klipning, barbering eller eventuelt med kemiske midler, afhængigt af testmetode. Huden må ikke irriteres. Dyrene vejes, inden forsøget påbegyndes, og ved forsøges afslutning.

1.5.1.2. Forsøgsbetingelser

1.5.1.2.1. Forsøgsdyr

Der benyttes albinomarsvin af almindeligt anvendte stammer.

1.5.1.2.2. Antal og køn

Der kan anvendes handyr og/eller hundyr. Hvis der benyttes hundyr, må de ikke have født, og de må ikke være drægtige.

Forsøgsgruppen skal bestå af mindst ti dyr og kontrolgruppen af mindst fem dyr. Hvis der anvendtes mindre end tyve forsøgsmarsvin og ti kontrolmarsvin og det ikke er muligt at konkludere, at teststoffet er sensibiliserende, anbefales det stærkt at teste stoffet i yderligere dyr, så der i alt er tale om mindst tyve forsøgsdyr og ti kontroldyr.

1.5.1.2.3. Dosisniveauer

Den koncentration af teststoffet, der anvendes ved hver induktionseksponering, må ikke forårsage systemiske gener og skal være den størst mulige, der forårsager mild til moderat hudirritation. Provokationskoncentrationen skal være den størst mulige, der ikke femkalder hudirritation. Hvis nødvendigt kan, de relevante koncentrationer bestemmes ved hjælp af en pilotundersøgelse med to eller tre dyr. Det bør overvejes at bruge FCA-behandlede dyr til dette formål.

1.5.1.3. Fremgangsmåde

1.5.1.3.1. Induktion

Dag 0 — forsøgsgruppe

Tre intradermale injektioner på 0,1 ml gives parvis i skulderpartiet — hvorfra hårlaget er fjernet — således, at hvert injektionspar består af en injektion på hver side af midterlinien.

Injektion 1: en blanding i forholdet 1:1 (volumenprocent) af FCA/vand eller fysiologisk saltopløsning.

Injektion 2: teststoffet i et passende vehikel i den udvalgte koncentration.

Injektion 3: teststoffet i den valgte koncentration i en blanding i forholdet 1:1 (volumenprocent) FCA/vand eller fysiologisk saltopløsning.

I injektion 3 opløses vandopløselige stoffer i vandfasen før de blandes med FCA. Fedtopløselige eller uopløselige stoffer opslæmmes i FCA forud for blanding med den vandige fase. Teststoffets slutkoncentration skal være den samme som i injektion 2.

Injektion 1 og 2 placeres tæt på hinanden og nærmest ved hovedet, mens injektion 3 placeres i den bageste del af testområdet.

Dag 0 — kontrolgruppe

Tre intradermale injektioner på 0,1 ml gives parvis på samme måde som for forsøgsdyrene.

Injektion 1: en blanding i forholdet 1:1 (volumenprocent) FCA/vand eller fysiologisk saltopløsning.

Injektion 2: det ufortyndede vehikel

Injektion 3: en 50 vægtprocent formulering af vehiklet i en blanding i forholdet 1:1 (volumenprocent) af FCA/vand eller fysiologisk saltopløsning.

Dag 5-7 — forsøgsgruppe og kontrolgruppe

Hvis stoffet ikke er hudirriterende, fremkaldes der, ca. 24 timer inden den lokale induktionsapplikation, en lokal irritation ved behandling af testområdet med 0,5 ml 10 % natriumlaurylsulfat i vaseline, efter klipning og/eller barbering.

Dag 6-8 — forsøgsgruppe

Testområdet klippes. Et stykke filtrerpapir (2 × 4 cm) gennemvædes med teststoffet, der er blandet med et passende vehikel, og anbringes på testområdet og fastholdes med en okklusiv forbinding i 48 timer. Valget af vehikel skal begrundes. Faste stoffer pulveriseres og inkorporeres i et passende vehikel. Væske kan eventuelt anvendes direkte.

Dag 6-8 — kontrolgruppe

Testområdet klippes. Vehikel alene anbringes på tilsvarende måde på testområdet og fastholdes med en okklusiv forbinding i 48 timer.

1.5.1.3.2. Provokation

Dag 20-22 — forsøgs- og kontrolgruppe

Både i forsøgsgruppen og i kontrolgruppen befries dyrenes flanke for hår. På forsøgsdyrenes ene side anbringes en lap eller en kapsel med teststoffet, og, hvis det er relevant, kan der også anbringes en lap eller en kapsel med rent vehikel på den anden side. Lapperne holdes i kontakt med huden i 24 timer med en okkulsiv forbinding.

1.5.1.3.3. Observation og scoring: forsøgs- og kontrolgruppe

— ca. 21 timer efter at lappen er fjernet, renses provokationsområdet og befries om nødvendigt for hår

— ca. 3 timer senere (ca. 48 timer efter påføring af provokationsdosis) observeres hudens reaktion, som registreres efter den scoringsskala, der er vist i tillægget

— ca. 24 timer efter denne observation foretages endnu en observation (72 timer), som registreres.

Blindlæsning af forsøgs- og kontroldyrene anbefales.

Hvis det er nødvendige at uddybe resultaterne af den første provokationseksponering, bør det overvejes at foretage endnu en provokationseksponering (dvs. en fornyet provokation), eventuelt med en ny kontrolgruppe, ca. 1 uge efter den første eksponering. En fornyet provokation kan også foretages på den oprindelige kontrolgruppe.

Alle hudreaktioner og alle usædvanlige virkninger, herunder systemiske reaktioner, af både induktions- og provokationseksponeringen skal observeres og registreres i henhold til Magnusson/Kligmans scoringsskala (se tillægget). Andre teknikker, f.eks. histopatologisk undersøgelse og måling af hudfortykkelse, kan benyttes til afklæring af tvetydige reaktioner.

1.5.2. *Buehler-test*

1.5.2.1. Forberedelser

Unge, sunde, kønsmodne albinomarsvin tilvænnes laboratoriebetingelserne i mindst fem dage forud for testen. Før forsøget begyndes, fordeles dyrene randomiseret i behandlingsgrupper. Behåring fjernes ved klipning, barbering eller eventuelt med kemiske midler, afhængigt af testmetode. Huden må ikke irriteres. Dyrene vejes, inden forsøget påbegyndes, og ved forsøges afslutning.

1.5.2.2. Forsøgsbetingelser

1.5.2.2.1. Forsøgsdyr

Der benyttes albinomarsvin af almindeligt anvendte stammer.

1.5.2.2.2. Antal og køn

Der kan anvendes handyr og/eller hundyr. Hvis der benyttes hundyr, må de ikke have født, og de må ikke være drægtige.

Forsøgsgruppen skal bestå af mindst 20 dyr og kontrolgruppen af mindst ti dyr.

1.5.2.2.3. Dosisniveauer

Der vælges en så høj koncentration af teststoffet for hver induktionseksponering, at der fremkaldes en mild, men ikke overdreven irritation. Provokationskoncentrationen bør være den størst mulige, der ikke fremkalder irritation. Hvis nødvendigt, kan, de relevante koncentrationer bestemmes ved hjælp af en pilotundersøgelse med to eller tre dyr.

For vandopløselige teststoffer kan der som vehikel bruges vand eller en fortyndet, ikke-irriterende opløsning af et overfladeaktivt stof. For andre teststoffer foretrækkes 80 % ethanol/vand til induktionseksponering og acetone til provokationseksponering.

1.5.2.3. Fremgangsmåde

1.5.2.3.1. Induktion

Dag 0 — forsøgsgruppe

Dyrene befries for hår (klippes tæt) på den ene flanke. Testlappesystemet skal være gennemvædet med teststoffet i et egnet vehikel (valg af vehikel skal begrundes; væsker kan eventuelt anvendes direkte). Testlappesystemet anbringes på testområdet og fastholdes i kontakt med huden med en okklusiv lap eller kapsel og en passende forbinding i seks timer.

Testlappesystemet skal være okklusivt. Et stykke gaze er passende: det kan være rundt eller firkantet, af en størrelse på ca. 4-6 cm^2. For at sikre okklusion foretrækkes det, at dyrenes bevægelsesfrihed begrænses med passende midler. Hvis der anvendes bandage, kan yderligere eksponering være nødvendig.

Dag 0 — kontrolgruppe

Dyrene befries for hår (klippes tæt) på den ene flanke. Vehiklet alene anbringes på testområdet på tilsvarende måde som for forsøgsgruppen. Testlappesystemet fastholdes i kontakt med huden med en okklusiv lap eller kapsel og en passende forbinding i seks timer. Hvis det kan påvises, at der ikke er behov for en placebo-kontrolgruppe, kan en ikke forud testet kontrolgruppe (naive control group) bruges.

Dag 6-8 og 13-15 — forsøgs- og kontrolgruppen

På dag 6-8 og igen på dag 13-15 foretages samme påføring som på dag 0 på samme testområde (om nødvendigt befriet for hår).

1.5.2.3.2. Provokation

Dag 27-29 — forsøgs- og kontrolgruppe

Både i forsøgsgruppen og i kontrolgruppen befries dyrene for hår (klippes tæt) på den anden flanke. Bagest på flanken på forsøgs- og kontroldyrene anbringes en okklusiv lap eller kapsel med en passende mængde teststof i den højest mulige koncentration, der ikke fremkalder irritation.

Hvis det er relevant, anbringes desuden en okklusiv lap eller kapsel med vehikel alene forrest på flanken på såvel forsøgs- som kontroldyr. Lapper og kapsler fastholdes i kontakt med huden med en passende forbinding i seks timer.

1.5.2.3.3. Observation og scoring

— ca. 21 timer efter at lappen er fjernet, befries provokationsområdet for hår

— ca. tre timer senere (ca. 30 timer efter påføring af provokationslap) observeres hudens reaktion, og denne registreres i henhold til den scoringsskala, der er vist i tillægget

— ca. 24 timer efter observationen efter 30 timer (dvs. 54 timer efter påføring af provokationslap) observeres hudens reaktioner igen og registreres.

Blindlæsning af forsøgs- og kontroldyrene anbefales.

Hvis det er nødvendigt at uddybe resultaterne af den første provokationseksponering, bør det overvejes at foretage endnu en provokationseksponering (dvs. en fornyet provokation), eventuelt med en ny kontrolgruppe, ca. 1 uge efter den første eksponering. En fornyet provokation kan også foretages på den oprindelige kontrolgruppe.

Alle hudreaktioner og alle usædvanlige virkninger, herunder systemiske reaktioner, af både induktions- og provokationseksponeringen skal observeres og registreres i henhold til Magnussen/Kligmans scoringsskala (se tillægget). Andre teknikker, f.eks. histopatologisk undersøgelse og måling af hudfortykkelse, kan benyttes til afklaring af tvetydige reaktioner.

2. DATA (GPMT OG BUEHLER-TEST)

Data opstilles i tabelform, som angiver hudens reaktion ved hver enkelt observation af hver enkelt dyr.

3. **RAPPORTERING (GPMT OG BUEHLER-TEST)**

Hvis der udføres en screeningtest inden marsvinetesten, skal der sammen med de resultater, der er opnået med test- og referencestofferne, gives en beskrivelse af eller henvisning til testen (f.eks. Local Lymph Node Assay (LLNA); Mouse Ear Swelling Test (MEST)), herunder oplysninger om fremgangsmåde.

Forsøgsrapport (GPMT og Buehler-test)

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

Forsøgsdyr:

— anvendt marsvinestamme

— dyrenes antal, alder og køn

— herkomst, laboratoriemiljø, foder osv.

— hvert enkelt dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

Forsøgsbetingelser:

— metode til forberedelse af stedet for anbringelse af lap

— oplysninger om anvendte lapmaterialer og metode til anbringelse af lapper

— resultat af forundersøgelse med konklusioner om de induktions- og provokationskoncentrationer, der skal anvendes i testen

— oplysninger om teststoffets tilberedning, påføring og fjernelse

— begrundelse for valg af vehikel

— de vehikel- og teststofkoncentrationer, der er anvendt til induktions- og provokationseksponering, og den samlede mængde stof, der er anvendt til induktion og provokation.

Resultater:

— resumé af resultaterne af den seneste følsomheds- og pålidelighedskontrol (jf. 1.3), herunder oplysninger om anvendt stof, koncentration og vehikel

— oplysninger om observationerne af hvert enkelt dyr, herunder scoringssystem

— beskrivende redegørelse for de observerede virkningers art og styrke

— eventuelle histopatologiske fund.

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. **LITTERATURHENVISNINGER**

Denne metode svarer til TG 406 fra OECD

Tillæg

TABEL:

Magnusson/Kligmans scoringsskala til vurdering af reaktionerne på provokationslappetest

0 = ingen synlig forandring

1 = afgrænset eller pletvis erytem

2 = moderat og sammenflydende erytem

3 = kraftigt erytem og hævelse.«

B.7 TOKSICITET VED GENTAGEN DOSERING (28 DAGE, ORAL)

1. METODE
1.1. Indledning
Se den generelle indledning til afsnit B.
1.2. Definitioner
Se den generelle indledning til afsnit B.
1.3. Testmetodens princip
Teststoffet indgives oralt dagligt i graduerede doser til grupper af forsoegsdyr, idet der gives en bestemt dosis til hver gruppe gennem en periode paa 28 dage. I eksponeringsperioden observeres dyrene hver dag omhyggeligt for tegn paa toksicitet. Dyr, der doer eller aflives under forsoeget, obduceres, og de overlevende dyr aflives og obduceres ved forsoegets afslutning.
Med denne metode laegges der stoerre vaegt paa neurologiske effekter som et specifikt endepunkt; dyrene
skal underkastes omhyggelige kliniske observationer med henblik paa indhentning af flest mulige
oplysninger. Metoden tager sigte paa at identificere kemiske stoffer med neurotoksisk potentiale, som i givet fald boer undersoeges noejere. Herudover kan metoden vise, om der er tegn paa immunologiske
effekter og toksicitet for koensorganerne.
1.4. Beskrivelse af testmetoden
1.4.1. Forberedelser
Unge, sunde, koensmodne dyr fordeles randomiseret i kontrol- og forsoegsgrupper. Burene boer anbringes
saaledes, at mulige virkninger som foelge af burenes placering minimeres. Dyrene maerkes individuelt
og tilbringer mindst fem dage i deres bure forud for forsoegets paabegyndelse, saa de tilvaennes laboratoriebetingelserne.
Teststoffet indgives med mavesonde, i foderet eller i drikkevandet, afhaengigt af formaalet med forsoeget og stoffets fysisk-kemiske egenskaber. Om noedvendigt oploeses eller opslaemmes teststoffet i
et egnet vehikel. Det anbefales, at der saa vidt muligt anvendes en vandig oploesning/opslaemning og,
hvis dette ikke er muligt, en oploesning/emulsion i olie (f.eks. majsolie) eller eventuelt en oploesning i andre vehikler. Ikke-vandige vehiklers toksiske egenskaber skal vaere kendt.
Teststoffets stabilitet i vehiklet boer bestemmes.
1.4.2. Forsoegsbetingelser
1.4.2.1. Forsoegsdyr
Rotten er den foretrukne gnaverart, skoent andre gnaverarter kan anvendes. Der benyttes unge, sunde
rotter af almindeligt anvendte laboratoriestammer. Hundyrene maa ikke have foedt og maa ikke vaere
draegtige. Dosering boer paabegyndes tidligst muligt efter fravaenning og under alle omstaendigheder,
inden rotterne er 9 uger gamle.
Ved forsoegets begyndelse skal vaegten af de anvendte dyr variere mindst muligt og ikke mere end ± 20
% af gennemsnitsvaegten af hvert koen.
Hvis en undersoegelse med gentagen oral dosis gennemfoeres som en forundersoegelse forud for en
langtidsundersoegelse, boer der saa vidt muligt anvendes dyr fra samme stamme og herkomst i

begge
undersoegelser.
1.4.2.2. Antal og koen
Der anvendes mindst ti dyr (fem hunner og fem hanner) ved hvert dosisniveau. Hvis der ifoelge forsoegsprotokollen skal aflives dyr under forsoeget, skal det oprindelige antal dyr foroeges med det
antal dyr, der paaregnes aflivet.
Man kan samtidig udsaette en satellitgruppe paa ti dyr (fem af hvert koen) for den hoejeste dosis i 28
dage og gennem en periode paa 14 dage efter forsoeget observere, om der er reversible, varige eller
forsinkede toksiske virkninger. Der anvendes tillige en satellitgruppe paa ti kontroldyr (fem af hvert koen).
1.4.2.3. Dosisniveauer
Der anvendes generelt mindst tre forsoegsgrupper og en kontrolgruppe. Dyrene i kontrolgruppen behandles noejagtigt som dyrene i forsoegsgrupperne, bortset fra indgiften af teststoffet. Hvis der anvendes et vehikel til indgift af teststoffet, skal kontrolgruppen indgive vehiklet det stoerste af de anvendte volumina.
Hvis der ud fra andre data ikke kan ventes virkninger ved en dosis paa 1 000 mg/kg legemsvaegt/dag,
kan der gennemfoeres en graensetest. Foreligger der ikke passende data, kan der udfoeres en »range
finding«-undersoegelse til bestemmelse af de doser, der skal anvendes.
Dosisniveauerne udvaelges under hensyntagen til eventuelle foreliggende data om teststoffet eller
beslaegtede stoffers toksicitet og (toksiko)kinetik. Den hoejeste dosis vaelges med henblik paa fremkaldelse af toksiske effekter, men ikke doed eller alvorlig lidelse. Normalt vaelges en faldende
raekke dosisniveauer til paavisning af eventuelt dosisafhaengigt respons og niveau hvor skadelige
effekter ikke kan observeres ved det laveste dosisniveau (NOAEL). Det optimale interval mellem to
doser er ofte en faktor paa 2-4, og tilfoejelse af en fjerde forsoegsgruppe er ofte at foretraekke frem
for anvendelse af meget store intervaller (f.eks. mere end en faktor paa 10) mellem dosisniveauerne.
For stoffer, der indgives med foder eller drikkevand, er det vigtigt at sikre, at de anvendte maengder af teststoffet ikke har indflydelse paa den normale ernaerings- eller vaeskebalance. Hvis
teststoffet indgives med foderet, kan man enten anvende en konstant koncentration i foderet (ppm)
eller en konstant dosering i forhold til dyrenes vaegt; det benyttede alternativ boer specificeres.
Hvis teststoffet indgives med mavesonde, goeres dette paa samme tidspunkt hver dag. Doserne justeres,
saa de er konstant i forhold til dyrenes legemsvaegt.
Hvis en undersoegelse med gentagen dosis anvendes som en forundersoegelse forud for en langtidsundersoegelse, boer foderet vaere det samme i begge undersoegelser.
1.4.2.4. Graensetest
Hvis en test med et dosisniveau paa mindst 1 000 mg/kg legemsvaegt/dag eller, ved indgift gennem
foder eller drikkevand, en tilsvarende procentdel i foderet eller drikkevandet (baseret paa

bestemmelse af legemsvaegten), udfoert efter nedenstaaende fremgangsmaade, ikke fremkalder erkendbare
toksiske virkninger, og hvis der ikke paa grundlag af data fra strukturelt beslaegtede stoffer kan ventes toksiske virkninger, kan en fuldstaendig undersoegelse med anvendelse af tre dosisniveauer
betragtes som unoedvendig. I dette tilfaelde boer graensetesten anvendes, medmindre human eksponering
viser, at der er behov for anvendelse af et hoejere dosisniveau.
1.4.2.5. Observationsperiode
Observationsperioden varer 28 dage. En eventuel satellitgruppe beregnet til opfoelgningsobservationer holdes i yderligere 14 dage uden indgift af teststof, saaledes at det kan registreres, om der er forsinkede, vedvarende eller reversible toksiske virkninger.
1.4.3. Fremgangsmaade
Dyrene indgives teststoffet dagligt syv dage om ugen i en periode paa 28 dage; fem dages dosering
pr. uge skal begrundes. Hvis teststoffet indgives med sonde, skal dette goeres i en enkelt dosis med
anvendelse af mavesonde eller passende intubationsroer. Det maksimale vaeskevolumen, som kan indgives
ad gangen, afhaenger af forsoegsdyrets stoerrelse. Volumen boer ikke overstige 1 ml/100 g legemsvaegt,
undtagen for vandige oploesninger, hvor 2 ml/100 g legemsvaegt kan anvendes. Med undtagelse af
irriterende eller aetsende stoffer, som normalt vil afsloere staerkere virkninger med hoejere koncentrationer, boer variationen i testvolumen minimeres ved at justere koncentrationen saaledes, at
der sikres en konstant volumen ved alle dosisniveauer.
1.4.3.1. Generelle observationer
Der foretages generelle kliniske observationer mindst én gang om dagen, om muligt paa det eller de
samme tidspunkter hver dag og under hensyntagen til, hvornaar de forventede virkninger efter dosering er staerkest. Dyrenes sundhedstilstand registreres. Dyrene observeres for sygelighed og doedelighed mindst to gange om dagen. Doeende og staerkt lidende dyr fjernes, saa snart de observeres,
aflives humant og obduceres.
Én gang foer den foerste eksponering (med henblik paa individbaserede sammenligninger) og mindst én
gang om ugen derefter foretages der indgaaende kliniske observationer af alle dyrene. Med henblik paa
disse observationer tages dyrene ud af deres egne bure og anbringes i et standardindelukke; Observationerne udfoeres om muligt paa samme tidspunkt hver gang. De registreres omhyggeligt, om
muligt med anvendelse af scoringssystemer, hvis anvendelse skal vaere klart defineret af forsoegslaboratoriet. Det er vigtigt at sikre, at forsoegsbetingelserne varierer minimalt, og at observationerne om muligt foretages af observatoerer, der ikke har kendskab til behandlingen. Observationerne boer bl.a. vaere rettet mod aendringer i hud, pels, oejne, slimhinder, forekomst af
sekretion, ekskretion og autonom aktivitet (f.eks. taareflod, strittende haarlag, pupilstoerrelse, usaedvanligt respirationsmoenster). Tillige registreres aendringer i gang, holdning og reaktion paa
haandtering saavel som forekomsten af kloniske eller toniske bevaegelser, stereotyp optraeden

(f.eks.
overdreven soignering, stadig kredsen i cirkelbevaegelser) eller maerkelig adfaerd (f.eks. automutilation, baglaens gang).
I den fjerde eksponeringsuge vurderes reaktiviteten over for sensoriske stimuli af forskellig art (f.eks. auditive, visuelle og proprioceptive stimuli), gribestyrke og motorisk aktivitet.
Litteraturen indeholder yderligere oplysninger om de undersoegelsesmetoder, der kan anvendes (se den
generelle indledning til afsnit B).
Funktionelle observationer i den fjerde eksponeringsuge kan udelades, hvis undersoegelsen gennemfoeres som en forundersoegelse til en efterfoelgende undersoegelse af subkronisk toksicitet (90
dage). I saa fald medtages de funktionelle observationer i den opfoelgende undersoegelse. Paa den anden
side kan data vedroerende funktionelle observationer fra undersoegelsen med gentagen dosis lette
valget af dosisniveauer for en efterfoelgende undersoegelse af subkronisk toksicitet.
I undtagelsestilfaelde kan funktionelle observationer ligeledes udelades for grupper, der viser saa tydelige tegn paa toksicitet, at det i signifikant grad ville indvirke paa resultaterne af den funktionelle test.
1.4.3.2. Legemsvaegt og indtagelse af foede/vand
Alle dyrene vejes mindst én gang om ugen. Indtagelsen af foede og vand maales mindst én gang om
ugen.
1.4.3.3. Haematologi
Foelgende haematologiske undersoegelser foretages ved forsoegsperiodens afslutning: haematokrit,
haemoglobinkoncentration, erythrocyttaelling, total og differential leucocyttaelling, blodpladetaelling
og en maaling af koaguleringsevne/tid.
Der tages blodproever fra et bestemt, angivet sted, lige inden eller i forbindelse med aflivning af dyrene; proeverne opbevares under passende betingelser.
1.4.3.4. Klinisk biokemi
Klinisk biokemiske bestemmelser med henblik paa undersoegelse af vigtige toksiske virkninger i vaev,
og navnlig i nyrer og lever, foretages med blodproever, der udtages fra alle dyr lige inden eller i forbindelse med dyrenes aflivning (bortset fra dem, der er fundet doeende og/eller som er aflivet under forsoeget). Det anbefales at dyrene faster natten over forud for blodproevetagning (1).
Undersoegelser af plasma eller serum skal omfatte natrium, kalium, glukose, total kolesterol, urinstof, kreatinin, total protein og albumin, mindst to enzymer, hvis forekomst kan vaere tegn paa
hepatocellulaere effekter (f.eks. alanin aminotransferase, aspartat aminotransferase, alkalisk phosphatase, gamma glutamyl transpeptidase og sorbitol dehydrogenase). Maalinger af yderligere
enzymer (fra lever eller andre organer) og galdesyrer kan under visse omstaendigheder give nyttige
oplysninger.
(1) For en raekke maalinger i serum og plasmaer skal dyrene helst have fastet natten over. Den vigtigste aarsag hertil er, at den oegede variation i resultaterne, som manglende faste uundgaaeligt
medfoerer, vil kunne skjule de mindre tydelige effekter og goere fortolkningen vanskelig. Paa den

anden side kan faste indvirke paa dyrenes generelle stofskifte og vil, navnlig i ernaeringsundersoegelser, forstyrre den daglige eksponering for teststoffet. Hvis der benyttes faste, boer analyserne udfoeres efter de funktionelle observationer i forsoegets fjerde uge.
Foelgende urinanalyser kan eventuelt udfoeres i forsoegets sidste uge til bestemmelse af: udseende, volumen, osmolalitet eller specifik vaegtfylde, pH, protein, glukose og blod/blodceller.
Endvidere boer det overvejes at gennemfoere undersoegelser af serummarkoerer for generelle vaevsskader.
Andre bestemmelser, der boer foretages, hvis teststoffets kendte egenskaber kan eller forventes at kunne indvirke paa tilsvarende metaboliske funktioner, omfatter kalcium, fosfat, triglycerider ved faste, visse hormoner, methaemoglobin og cholinesterase. Disse forhold undersoeges for stoffer i bestemte stofgrupper eller fra tilfaelde til tilfaelde.
Der er generelt brug for en fleksibel fremgangsmaade, afhaengigt af dyreart og de observerede og/eller forventede effekter ved et givet stof.
Hvis der ikke foreligger passende data fra tidligere undersoegelser, boer det overvejes at bestemme haematologiske og klinisk biokemiske variable, inden eksponering paabegyndes.

1.4.3.5. Makroskopisk undersoegelse

Alle forsoegsdyrene underkastes en fuldstaendig og tilbundsgaaende makroskopisk undersoegelse, der omfatter omhyggelig undersoegelse af kroppens ydre, alle aabninger samt af kraniehule, brysthule og bughule og indholdet heraf. Lever, nyrer, binyrer, testes, bitestikler, thymus, milt, hjerne og hjerte fra alle dyr befries for alt vedhaengende vaev og vejes hurtigst muligt efter udtagning, saa udtoerring undgaas.
Foelgende vaev praeserveres i det bedst egnede fikseringsmiddel baade med hensyn til vaevstype og den paataenkte efterfoelgende histopatologiske undersoegelse: alle makroskopiske laesioner, hjerne (repraesentative regioner, herunder cerebrum, cerebellum og pons), rygmarv, mavesaek, tyktarm og tyndtarm (herunder Peyerpletter), lever, nyrer, binyrer, milt, hjerte, thymus, skjoldbruskkirtel, spiseroer og lunger (praeserveret ved oppumpning med fikseringsmiddel og efterfoelgende immersion), gonader, sekundaere koensorganer (f.eks. uterus, prostata), urinblaere, lymfeknuder (om muligt en lymfeknude, der har beroering med indgiftsvejen, og en anden lymfeknude langt fra indgiftsvejen, som kan vise systemiske virkninger), perifer nerve (ischias- eller tibianerven), om muligt taet paa musklen, og et knoglemarvssnit (eller som alternativt et nyligt praepareret knoglemarvsaspirat). De kliniske og oevrige resultater kan vise, at der er behov for at undersoege yderligere vaev. Ogsaa organer, der paa grundlag af teststoffets kendte egenskaber kan forventes at vaere maalorganer, praeserveres.

1.4.3.6. Histopatologisk undersoegelse

Der foretages en fuldstaendig histologisk undersoegelse af de praeserverede organer og vaev fra alle dyr i kontrolgruppen og i hoejdosis-gruppen. I disse undersoegelser inddrages dyr fra alle de andre

dosisgrupper, hvis der i hoejdosis-gruppen observeres eksponeringsrelaterede aendringer.
Alle makroskopiske laesioner undersoeges.
Bruges der en satellitgruppe, udfoeres der en histopatologisk undersoegelse af vaev og organer, der
udviser toksisk virkning i de oevrige grupper.
2. DATA
Der tilvejebringes data for hvert enkelt dyr. Derudover opstilles alle data i tabelform, som for hver gruppe viser antallet af dyr ved begyndelsen af forsoeget, antallet af dyr, der er fundet doede
under forsoeget eller aflivet af humane aarsager, og tidspunktet for doedsfald eller human aflivning,
antal dyr, der viser tegn paa toksicitet, en beskrivelse af de observerede tegn paa toksicitet, herunder tidspunktet for de toksiske virkningers indtraeden, varigheden og styrke, antallet af dyr, der udviser laesioner, typen af laesioner, og procentdelen af dyr, der udviser hver enkelt type laesion.
Numeriske resultater vurderes om muligt med en passende og generelt accepteret statistisk metode.
De statistiske metoder udvaelges i forbindelse med forsoegets tilrettelaeggelse.
3. RAPPORTERING
Forsoegsrapport
Forsoegsrapporten skal om muligt indeholde foelgende oplysninger:
Forsoegsdyr:
- anvendt art/stamme
- dyrenes antal, alder og koen
- herkomst, laboratoriemiljoe, foder osv.
- hvert enkelt dyrs vaegt ved forsoegets paabegyndelse, herefter med ugentlige mellemrum og ved
forsoegets afslutning.
Forsoegsbetingelser:
- begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand
- begrundelse for valg af dosisniveau
- oplysninger om formulering af teststof eller tilblanding heraf i foderet, opnaaet koncentration, foderblandingens stabilitet og homogenitet
- oplysninger om stoffets indgift
- omregning af teststoffets koncentration (ppm) i foder/drikkevand til faktisk dosis (mg/kg/legemsvaegt/dag), hvis relevant
- oplysninger om foder- og vandkvalitet.
Resultater:
- legemsvaegt/aendringer i legemsvaegt
- foderindtagelse og vandindtagelse, hvis relevant
- oplysninger om toksiske reaktioner efter koen og dosis, herunder tegn paa toksicitet
- de kliniske observationers art, styrke og varighed, reversible og ikke-reversible
- vurdering af sanseevne, gribestyrke og motorisk aktivitet
- haematologiske tests med relevante referencevaerdier
- klinisk biokemiske tests med relevante referencevaerdier
- legemsvaegt ved aflivning og organvaegte
- obduktionsfund
- en detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund
- oplysninger om absorption, hvis disse foreligger
- statistisk behandling af resultaterne, hvis relevant.
Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. REFERENCER

Denne metode svarer til TG 407 fra OECD.

B.8. TOKSICITET VED GENTAGEN DOSERING (28 DAGE, INHALATION)

1. METODE
1.1. INDLEDNING
Det er nyttigt at have forhaandsoplysninger om stoffets partikelstoerrelsesfordeling, damptryk, smeltepunkt, kogepunkt, flammepunkt og eventuelle eksplosive egenskaber.Se ogsaa den generelle indledning til afsnit B (punkt A).

1.2. DEFINITIONER
Se den generelle indledning til afsnit B (punkt B).

1.3. REFERENCESTOFFER
Ingen.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP
Flere grupper af forsoegsdyr udsaettes i 28 dage dagligt i en angivet periode for teststoffet i graduerede koncentrationer, idet hver gruppe eksponeres for en bestemt koncentration. Anvendes der et vehikel til at frembringe en passende koncentration af teststoffet i luften, boer der i forsoeget indgaa en kontrolgruppe, der udsaettes for vehiklet alene. I eksponeringsperioden observeres dyrene dagligt for symptomer paa toksisk virkning. Dyr, der doer under forsoeget, obduceres, og ved forsoegets afslutning aflives og obduceres de overlevende dyr.

1.5. KVALITETSKRITERIER
Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN
1.6.1. Forberedelser
Dyrene holdes under forsoegsbetingelser med hensyn til miljoe og fodring i mindst fem dage, inden forsoeget begyndes. Unge sunde dyr fordeles randomiseret i det fornoedne antal grupper. Om noedvendigt kan der tilsaettes et egnet vehikel til teststoffet, saaledes at der opnaas en passende koncentration af teststoffet i luften. Hvis der anvendes et vehikel eller andre tilsaetnings stoffer for at lette doseringen, skal det vaere paavist, at de ikke har nogen toksisk virkning. Her kan tidligere data benyttes.

1.6.2. Forsoegsbetingelser
1.6.2.1. Forsoegsdyr
Rotter er de foretrukne forsoegsdyr, medmindre der foreligger kontraindikationer. Der benyttes unge sunde rotter af almindeligt anvendte stammer.
Ved forsoegets begyndelse maa vaegten af de anvendte dyr ikke variere mere end ± 20 % fra en rimelig gennemsnitsvaegt.

1.6.2.2. Antal og koen
Der anvendes mindst 10 dyr (fem hunner og fem hanner) i hver forsoegsgruppe. Hundyrene maa ikke have foedt og maa ikke vaere draegtige. Hvis der paaregnes aflivning af dyr under forsoeget, skal det oprindelige antal dyr foroeges med det antal dyr, man paaregner at aflive i loebet af forsoeget. Man kan samtidig udsaette en satellitgruppe paa 10 dyr (fem af hvert koen) for den hoejeste koncentration i 28 dage og gennem en periode paa 14 dage efter forsoeget observere, om der er reversible, varige eller sent opstaaede toksiske virkninger. Der anvendes tillige en satellitgruppe paa 10 kontroldyr (fem af hvert koen).

1.6.2.3. Eksponeringskoncentrationer

Der skal anvendes mindst tre koncentrationsniveauer og en kontrolgruppe eller en vehikelkontrolgruppe (svarende til koncentrationen af vehiklet i hoejeste dosisniveau), saafremt der benyttes vehikel. Dyrene i kontrolgruppen behandles noejagtigt som dyrene i forsoegsgrupperne, bortset fra inhalation af teststoffet. Den hoejeste koncentration boer have toksisk virkning, men kun medfoere faa eller ingen doedsfald. Der maa ikke vaere tegn paa toksisk virkning ved den laveste koncentration. Hvis der foreligger en anvendelig vurdering af menneskers eksponering for stoffet, skal den laveste koncentration overskride denne eksponering. Middelkoncentrationen skal helst frembringe saa svage observerbare toksiske virkninger som muligt. Hvis der anvendes mere end tre koncentrationer, boer de vaelges saaledes, at der opnaas graduering af de toksiske virkninger. I grupperne med lav og middel koncentration og i kontrolgrupperne skal doedeligheden holdes paa et lavt niveau, saa der bliver mulighed for en meningsfuld vurdering af resultaterne.

1.6.2.4. Eksponeringstid
Den daglige eksponeringsperiode er seks timer, men det kan vaere noedvendigt at benytte kortere eller laengere perioder for at imoedekomme specielle krav.

1.6.2.5. Udstyr
Dyrene testes med inhalationsapparatur, der er udformet saaledes, at der kan opretholdes en dynamisk luftcirkulation med et luftskifte paa mindst 12 gange pr. time samtidig med et tilstraekkeligt iltindhold og jaevn fordeling af eksponeringsluften. Benyttes der eksponeringskammer, skal det vaere saaledes indrettet, at forsoegsdyrene sammenklumpes mindst muligt og eksponeres mest muligt for teststoffet ved inhalation. Den generelle regel for sikkerhed for stabil atmosfaere er, at dyrenes totale »volumen« ikke maa overstige 5 % af eksponeringskammerets volumen. Eksponeringen kan foregaa gennem mund-naese, hovedet alene eller ved kamre til hele kroppen; ved anvendelse af de to foerste muligheder opnaar man, at optagelsen af teststoffet ad andre veje minimeres.

1.6.2.6. Observationsperiode
Dyrene observeres dagligt for symptomer paa toksiske virkninger i hele forsoegsperioden og restitutionsperioden. Doedstidspunkt og tidspunkter for toksicitetssymptomers fremkomst og forsvinden registreres.

1.6.3. Fremgangsmaade
Dyrene eksponeres for teststoffet dagligt 5-7 dage om ugen i en periode paa 28 dage. En eventuel satellitgruppe beregnet til opfoelgningsobservationer holdes i yderligere 14 dage, efter at eksponering for teststoffet er ophoert, saaledes at det kan registreres, om toksiske virkninger er reversible, eller om de vedvarer. Temperaturen under forsoeget holdes paa 22 C ± 3 C.
Under ideelle forhold skal den relative luftfugtighed holdes paa mellem 30 % og 70 %, men i visse tilfaelde (f.eks. ved testning af visse aerosoler) kan det vaere praktisk uigennemfoerligt.
Udsivning af teststof til omgivelserne kan forhindres ved, at der i kammeret holdes et svagt undertryk (≤ 5 mm vandsoejle). Der gives hverken foder eller vand under eksponeringen.
Der anvendes et dynamisk inhalationssystem med et passende analytisk kontrolsystem til sikring af eksponeringskoncentrationen. Det anbefales at foretage en proevetest for at finde frem til passende eksponeringskoncentrationer. Lufthastigheden tilpasses, saaledes at der er ensartede forhold i hele eksponeringskammeret. Systemet skal vaere af en saadan beskaffenhed, at der saa hurtigt som muligt opnaas stabile eksponeringsbetingelser.
Der foretages maaling og kontrol af
(a) lufthastighed (kontinuerlig)
(b) den faktiske koncentration af teststoffet maalt i opholdsarealet. Koncentrationen maa under den daglige eksponeringsperiode ikke variere mere end ± 15 % fra gennemsnitskoncentrationen.

Det kan vaere umuligt at opnaa en saadan grad af kontrol med visse aerosoler, og i saa tilfaelde kan stoerre udsving accepteres. Koncentrationerne boer fra dag til dag holdes saa konstante som muligt under hele forsoegets forloeb. For aerosoler analyseres partikelstoerrelsen mindst én gang ugentligt pr. forsoegsgruppe.
(c) temperatur og luftfugtighed, om muligt kontinuerligt.
Under og efter eksponering foretages der systematiske observationer, som registreres for hvert enkelt dyr. Alle dyr observeres dagligt, og toksicitetssymptomer registreres, herunder hvornaar disse symptomer optraeder foerste gang, hvor laenge de varer, og hvor kraftige de er. Inspektionen af dyrene skal omfatte forandringer i hud og pels, oejne og slimhinder, aandedraet og kredsloeb, det autonome og det centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfaerdsmoensteret. Dyrene vejes én gang om ugen. Det anbefales, at der ogsaa holdes regnskab med den ugentlige foedeindtagelse. Dyrene observeres med jaevne mellemrum, saa dyr ikke gaar tabt for undersoegelsen paa grund af f.eks. kannibalisme, autolyse af vaev eller forveksling. Ved forsoegets slutning aflives og obduceres alle overlevende dyr med undtagelse af dem i satellitgruppen. Doeende dyr og dyr, der viser symptomer paa staerk smerte eller lidelse, fjernes, saa snart de iagttages, hvorefter de aflives paa human maade og obduceres.
Ved forsoegets afslutning skal alle dyr inklusive kontrolgruppen underkastes foelgende undersoegelser
(i) haematologisk analyse omfattende mindst haematokrit, haemoglobinkoncentration, erythrocyttaelling, total og differential leucocyttaelling og et maal for koaguleringsevnen.
(ii) klinisk biokemisk blodanalyse omfattende mindst én lever- og nyrefunktionsparameter: serum alanin aminotransferase (ALAT), serum aspartat aminotransferase (ASAT), urinstof, albumin, kreatinin, total bilirubin og total serumprotein.
Andre bestemmelser, der kan vaere paakraevet for en fyldestgoerende toksikologisk vurdering, er calcium, phosphor, chlorid, natrium, kalium, glucose efter faste, lipidanalyser, hormoner, syre/basebalance, methaemoglobin og cholinesteraseaktivitet.
Der kan udfoeres yderligere klinisk biokemiske analyser, hvor det skoennes noedvendigt for en videre undersoegelse af de observerede virkninger.

1.6.3.1. Makroskopisk undersoegelse
Alle forsoegsdyrene underkastes en fuldstaendig makroskopisk undersoegelse. Lever, nyrer, binyrer, lunger og testes vejes saa hurtigt som muligt efter udtagning, saa udtoerring undgaas. Vaev og organer (luftveje, lever, nyrer, milt, testes, binyrer, hjerte og organer, der udviser makrokopiske laesioner eller stoerrelsesforandringer) opbevares i et passende medium med henblik paa eventuel senere histopatologisk undersoegelse. Lunger udtages hele og intakte, vejes og behandles med et passende fixativ for at sikre, at lungestrukturen bevares.

1.6.3.2. Histopatologisk undersoegelse
Der foretages en histologisk undersoegelse af praepareret vaev og organer fra dyrene i kontrolgruppen samt i den gruppe, der har vaeret udsat for den hoejeste koncentration. Observeres der i gruppen med den hoejeste koncentration vaevs- eller organdefekter, som kan tilskrives teststoffet, undersoeges de samme vaev og organer i grupperne med lavere koncentration. Dyrene i en eventuel satellitgruppe underkastes en histologisk undersoegelse, isaer de vaev og organer, der udviser toksisk virkning i de oevrige grupper.

2. DATA
Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsoeget, og for hver type af laesion det antal dyr, der udviser den paagaeldende laesion.
Evaluering af samtlige observationer skal baseres paa en passende statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. RAPPORTERING

3.1. FORSOEGSRAPPORT

Forsoegsrapporten skal om muligt indeholde foelgende oplysninger

- dyreart/stamme, herkomst, miljoebetingelser, foder o.s.v.
- forsoegsbetingelser

Beskrivelse af eksponeringsudstyret, herunder udformning, type, dimensionering, luftkilde, system til frembringelse af aerosoler, metode til konditionering af luften, behandling af udpumpet luft og den maade, hvorpaa dyrene holdes i et eksponeringskammer, naar et saadant benyttes. Apparatur til maaling af temperatur, fugtighed og i givet fald aerosolkoncentrationens stabilitet eller partikelstoerrelse skal beskrives.

Eksponeringsdata

Disse skal opstilles i tabelform med angivelse af middelvaerdier og et maal for variationen (f.eks. standardafvigelser) og i videst muligt omfang omfatte

a) lufthastighed gennem inhalationsudstyret
b) luftens temperatur og fugtighed
c) nominelle koncentrationer (total maengde teststof tilfoert inhalationsapparaturet, divideret med luftvolumen)
d) type vehikel, hvor et saadant er anvendt
e) faktiske koncentrationer i opholdsarealet under forsoeget
f) massemedianen af den aerodynamiske diameter (MMAD) og den geometriske standardafvigelse (GSD)

- oplysninger om toksisk reaktion opdelt efter koen og koncentration
- angivelse af dyrenes doedstidspunkt under forsoeget eller overlevelse til forsoegets slutning
- beskrivelse af toksiske og andre virkninger; nuleffektniveau
- for hvert enkelt abnormitetstegn det tidspunkt, hvor det er observeret, og dets senere udvikling
- foder- og legemsvaegt
- haematologiske analyser og samtlige resultater
- klinisk biokemiske analyser og samtlige resultater
- obduktionsfund
- detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund
- eventuel statistisk behandling af resultaterne
- diskussion af resultaterne
- fortolkning af resultaterne.

3.2. VURDERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt D).

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt E).

B.9. TOKSICITET VED GENTAGEN DOSERING (28 DAGE, DERMAL)

1. METODE
1.1. INDLEDNING
Se den generelle indledning til afsnit B (punkt A).

1.2. DEFINITIONER
Se den generelle indledning til afsnit B (punkt B).

1.3. REFERENCESTOFFER
Ingen.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP
Teststoffet paafoeres dagligt huden i graduerede doser paa grupper af forsoegsdyr, idet der anvendes en bestemt dosis til hver gruppe gennem en periode paa 28 dage. I eksponeringsperioden observeres dyrene dagligt for symptomer paa toksisk virkning. Dyr, der doer under forsoeget, obduceres, og ved forsoegets afslutning aflives og obduceres de overlevende dyr.

1.5. KVALITETSKRITERIER
Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN
1.6.1. Forberedelser
Dyrene holdes under forsoegsbetingelser med hensyn til miljoe og fodring i mindst fem dage, inden forsoeget paabegyndes. Unge sunde dyr fordeles randomiseret i forsoegs- og kontrolgrupper, inden forsoeget saettes i gang. Kort foer forsoeget indledes, klippes dyrene paa ryggen. Saafremt dyrene barberes, boer det ske ca. 24 timer, inden forsoeget indledes. Klipningen eller barberingen maa som regel gentages med en uges mellemrum. Man maa ved klipning og barbering passe paa ikke at beskadige huden. Mindst 10 % af kroppens overflade klargoeres til paafoering af teststoffet. Ved afgoerelse af, hvilket og hvor stort et omraade der skal klippes, boer der tages hensyn til dyrets vaegt. Ved testning af faste stoffer, som i givet fald kan pulveriseres, skal teststoffet fugtes tilstraekkeligt med vand eller om noedvendigt med et passende vehikel, saa der sikres god kontakt med huden. Flydende teststoffer paafoeres normalt ufortyndet. Teststoffet paafoeres dagligt 5-7 dage om ugen.

1.6.2. Forsoegsbetingelser
1.6.2.1. Forsoegsdyr
Der kan anvendes voksne rotter, kaniner eller marsvin. Der kan ogsaa anvendes andre dyrearter, men i saa fald skal det begrundes.
Ved forsoegets begyndelse maa vaegten af de anvendte dyr ikke variere mere end ± 20 % fra en rimelig gennemsnitsvaegt.

1.6.2.2. Antal og koen
Der anvendes mindst 10 dyr (fem hunner og fem hanner) med sund hud til hvert dosisniveau. Hunnerne maa ikke have foedt og maa ikke vaere draegtige. Hvis der paaregnes aflivning af dyr under forsoeget, skal det oprindelige antal dyr foroeges med det antal dyr, man paaregner at aflive i loebet af forsoeget. Man kan samtidig udsaette en satellitgruppe paa 10 dyr (fem af hvert koen) for den hoejeste dosis i 28 dage og gennem en periode paa 14 dage efter forsoeget observere, om der er reversible, varige eller forsinkede toksiske virkninger. Der anvendes tillige en satellitgruppe paa 10 kontroldyr (fem af hvert koen).

1.6.2.3. Dosisniveauer
Der skal anvendes mindst tre dosisniveauer samt en kontrolgruppe eller en vehikelkontrolgruppe, saafremt der benyttes vehikel. Eksponeringsperioden er paa mindst seks timer dagligt. Teststoffet paafoeres paa omtrent samme tidspunkt hver dag, og doserne justeres med jaevne mellemrum (én gang eller to gange om uge), saa de er konstante i forhold til dyrenes legemsvaegt. Dyrene i kontrolgruppen behandles noejagtigt som dyrene i forsoegsgrupperne, bortset fra paafoering af teststoffet. Hvis der anvendes et vehikel til at lette doseringen, skal vehikelkontrolgruppen eksponeres paa samme maade som forsoegsgrupperne og paafoeres samme maengde vehikel som den gruppe, der modtager den hoejeste dosis. Den hoejeste dosis boer have toksisk virkning, men kun medfoere faa eller ingen doedsfald. Det laveste dosisniveau boer ikke have nogen toksisk virkning overhovedet. Hvis der foreligger en anvendelig vurdering af menneskers eksponering for stoffet, skal det laveste dosisniveau overskride denne eksponering. Middeldosis skal helst frembringe saa svage observerbare toksiske virkninger som muligt. Hvis der anvendes mere end tre dosisniveauer, boer de vaelges saaledes, at der opnaas graduering af de toksiske virkninger. I grupperne med lav og middel dosis og i kontrolgrupperne skal doedeligheden holdes paa et lavt niveau, saa der bliver mulighed for en meningsfuld vurdering af resultaterne. Hvis paafoering af teststoffet foraarsager alvorlig hudirritation, saenkes koncentrationen, hvilket kan medfoere, at andre toksiske virkninger paa det hoejeste dosisniveau svaekkes eller forsvinder. Hvis huden er blevet alvorligt beskadiget, kan det vaere noedvendigt at afslutte forsoeget og foretage et nyt forsoeg med lavere koncentrationer.

1.6.2.4. Graensetest
Hvis der i en indledende undersoegelse med en dosis paa 1 000 mg/kg legemsvaegt eller en stoerre dosis fastsat ud fra kendskab til den eksponering, mennesker kan blive udsat for, ikke konstateres nogen toksisk virkning, kan yderligere test betragtes som unoedvendige.

1.6.2.5. Observationsperiode
Dyrene observeres dagligt for symptomer paa toksicitet. Doedstidspunkt og tidspunkter for toksicitetssymptomers fremkomst og forsvinden registreres.

1.6.3. Fremgangsmaade
Dyrene holdes i hver sit bur. Den ideelle dosering bestaar i paafoering af teststoffet syv dage om ugen i en periode paa 28 dage. En eventuel satellitgruppe beregnet til opfoelgningsobservationer holdes i yderligere 14 dage uden paafoering af teststof, saaledes at det kan registreres, om toksiske virkninger er reversible, eller om de vedvarer. Den daglige eksponeringsperiode er paa mindst seks timer.
Teststoffet paafoeres jaevnt over et omraade, som svarer til ca. 10 % af den samlede legemsoverflade. Med staerkt toksiske stoffer kan der anvendes et mindre omraade, men stoffet skal paafoeres saa tyndt og ensartet over en saa stor del af omraadet som muligt.
Teststoffet skal holdes i kontakt med huden ved hjaelp af en poroes gazeforbinding og en ikke-hudirriterende klaebestrimmel. Teststedet skal desuden tildaekkes paa en saadan maade, at gazeforbindingen og teststoffet holdes sikkert fast, saa at dyrene ikke kan indtage teststoffet. Der kan anvendes andre foranstaltninger, som forhindrer dyrene i at indtage teststoffet; dog kan fuldstaendig immobilisering ikke anbefales. Alternativt kan der benyttes en beskyttelseskrave. Ved eksponeringsperiodens afslutning fjernes tilbagesiddende teststof, idet der f.eks. anvendes vand eller et andet egnet middel til at rense huden.
Alle ddy observvres daagigt, oggtoosicitetssymptomer reeiitreres, heruudee hvornaar disse symptomer optraeder foerste gang, hvor laenge de varer, og hvor kraftige de er. Inspektion af dyrene skal omfatte forandringer i hud og pels, oejne og slimhinder, aandedraet og kredsloeb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfaerdsmoensteret. Dyrene vejes

én gang om ugen. Det anbefales, at der ogsaa holdes regnskab med den ugentlige foedeindtagelse. Dyrene observeres med jaevne mellemrum, saa dyr ikke gaar tabt for undersoegelsen paa grund af f.eks. kannibalisme, autolyse af vaev eller forveksling. Ved forsoegets slutning aflives og obduceres alle overlevende dyr med undtagelse af dem i satellitgrupperne. Doeende dyr og dyr, der viser symptomer paa staerk smerte eller lidelse, fjernes, saa snart de iagttages, hvorefter de aflives paa human maade og obduceres.
Ved forsoegets afslutning skal alle dyr inklusive kontrolgruppen underkastes foelgende undersoegelser
1) haematologisk analyse omfattende mindst haematokrit, haemoglobinkoncentration, erythrocyttaelling, total og differential leucocyttaelling og et maal for koaguleringsevnen.
2) klinisk biokemisk blodanalyse omfattende mindst én lever- og nyrefunktionsparameter: serum alanin aminotransferase (ALAT), serum aspartat aminotransferase (ASAT), urinstof, albumin, kreatinin, total bilirubin og total serumprotein.
Andre bestemmelser, der kan vaere paakraevet for en fyldestgoerende toksikologisk vurdering, er calcium, phosphor, chlorid, natrium, kalium, glucose efter faste, lipidanalyser, hormoner, syre/basebalance, methaemoglobin og cholinesteraseaktivitet.
Der kan udfoeres yderligere klinisk biokemiske analyser, hvor det skoennes noedvendigt for videre undersoegelse af observerede virkninger.

1.6.4. Makroskopisk undersoegelse
Alle forsoegsdyrene underkastes en fuldstaendig makroskopisk undersoegelse. Lever, nyrer, binyrer testes og vejes saa hurtigt som muligt efter udtagningen, saa udtoerring undgaas. Vaev og organer, d.v.s. normal og eksponeret hud, lever, nyrer, milt testes, binyrer, hjerte og maalorganer (d.v.s. organer, der udviser makroskopiske laesioner eller forandringer i stoerrelse) opbevares i et passende medium med henblik paa eventuel senere histopatologisk undersoegelse.

1.6.5. Histopatologisk undersoegelse
Der foretages en histologisk undersoegelse af praepareret vaev og organer fra dyrene i kontrolgruppen samt i den gruppe, der har vaeret udsat for den stoerste dosis. Observeres der i gruppen med den hoejeste dosis vaevs- eller organdefekter, som kan tilskrives teststoffet, undersoeges de samme vaev og organer i grupperne med lavere dosis. Dyrene i satellitgruppen underkastes en histologisk undersoegelse, isaer de vaev og organer, der udviser virkning i de oevrige grupper.

2. DATA
Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antallet af dyr ved begyndelsen af forsoeget, og for hver type laesion det antal dyr, der udviser den paagaeldende laesion.
Evaluering af samtlige observationer skal baseres paa en passende statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. RAPPORTERING

3.1. FORSOEGSRAPPORT
Forsoegsrapporten skal om muligt indeholde foelgende oplysninger
- dyreart/stamme, herkomst, miljoebetingelser, foder o.s.v.
- forsoegsbetingelser (herunder forbindingstypen: med eller uden okklusion)
- dosisniveauer (med angivelse af vehikel, hvor et saadant er anvendt) samt koncentration
- nuleffektniveau, hvor det er muligt
- oplysninger om toksiske reaktioner opdelt efter koen og dosis
- angivelse af dyrenes doedstidspunkt under forsoeget eller overlevelse til forsoegets slutning
- toksiske og andre virkninger

- for hvert enkelt abnormitetstegn det tidspunkt, hvor det er observeret, og dets senere udvikling
- foder- og legemsvaegt
- haematologiske analyser og samtlige resultater
- klinisk biokemiske analyser og samtlige resultater
- obduktionsfund
- detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund
- eventuel statistisk behandling af resultaterne
- diskussion af resultaterne
- fortolkning af resultaterne.

3.2. VURDERING OG FORTOLKNING
Se den generelle indledning til afsnit B (punkt D).

4. LITTERATURHENVISNINGER
Se den generelle indledning til afsnit B (punkt E).

B.10 MUTAGENICITET – IN VITRO-TEST FOR KROMOSOMABERRATIONER I PATTEDYR

1. METODE

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 473 "*In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test" (1997).

1.1 INDLEDNING

Formålet med in vitro-testen for kromosomaberrationer er et påvise, om et stof eller andet forårsager strukturelle kromosomafvigelser i dyrkede pattedyrceller (1)(2)(3). Der er to typer strukturændringer, kromosomtypen og kromatidtypen. De fleste kemiske mutagener forårsager ændringer af kromatidtypen, men også ændringer af kromosomtypen forekommer. Ploiditetsforøgelse kan være tegn på, at et kemisk stof er i stand til at fremkalde antalsafvigelser. Den foreliggende metode er imidlertid ikke beregnet til at påvise antalsafvigelser og benyttes ikke rutinemæssigt til dette formål. Kromosommutationer og lignende er årsag til mange genetiske sygdomme hos mennesker, og meget tyder på, at kromosommutationer og lignende, som ændrer på onkogener og tumorsuppressorgener i somatiske celler, medvirker ved induktion af kræft hos mennesker og i forsøgsdyr.

I in vitro-testen for kromosomaberrationer kan der benyttes kulturer af etablerede cellelinjer, cellestammer eller primære cellekulturer. Cellerne udvælges på grundlag af deres vækstegenskaber ved dyrkning, karyotypens stabilitet, kromosomtal, kromosomdiversitet og hyppighed af spontane kromosomaberrationer.

Ved udførelse af in vitro-test er det i regelen nødvendigt at benytte en exogen kilde til metabolismeaktivering. Et sådant metabolismeaktiveringssystem kan ikke fuldstændig efterligne betingelserne i et levende pattedyr. Man må omhyggeligt undgå betingelser, som fører til et positivt resultat, der ikke skyldes selve mutageniciteten men kan være forårsaget af ændringer i pH eller osmolalitet eller høj cytotoksicitet (4)(5).

Testen benyttes til at screene for stoffer, der kan være mutagene eller carcinogene hos pattedyr. Mange af de stoffer, der giver positivt resultat med denne test, er kræftfremkaldende hos pattedyr, men der er ikke fuldstændig korrelation mellem testen og carcinogenicitet. Korrelationen afhænger af den kemiske sammensætning, og der er stadig tydeligere tegn på, at nogle carcinogener ikke påvises ved denne test, fordi de lader til at virke via andre mekanismer end direkte beskadigelse af DNA.

Se også den generelle indledning til afsnit B.

1.2 DEFINITIONER

Aberration af kromatidtypen: beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på enkeltkromatider eller brud på og sammenføjning af kromatider.

Aberration af kromosomtypen: beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på - eller brud på og sammenføjning af - begge kromatider på samme sted.

Endo-fordobling: en proces, hvorved cellekernen efter en S-fase i DNA-replikationen ikke fortsætter over i mitosen men påbegynder endnu en S-fase. Resultatet er kromosomer med 4, 8, 16, ... kromatider.

Gap: en akromatisk beskadigelse, som er mindre end ét kromatid bred, og hvor misalignment af kromatiderne er minimal.

Mitoseindeks: forholdet mellem antallet af celler i metafase og det samlede antal celler i en population; det viser populationens formeringsgrad.

Antalsafvigelse: ændring i kromosomtallet i forhold til det for de pågældende celler normale antal.

Polyploidi: et multiplum af det haploide kromosomtal (n), som ikke er det diploide tal (dvs. 3n, 4n, osv.).

Strukturel ændring: ændring i kromosomstrukturen, som kan iagttages ved mikroskopi i celledelingens metafase i form af deletioner og fragmenter, intrachange og interchange.

1.3 TESTMETODENS PRINCIP

Cellekulturer udsættes for teststoffet både med og uden metabolismeaktivering. Efter forud fastsatte tidsrum efter at være udsat for teststoffet behandles kulturerne med et metafasestandsende stof (f.eks. Colcemid® eller colchicin), hvorefter de høstes og farves; dernæst undersøges metafasecellerne mikroskopisk for forekomst af kromosomaberrationer.

1.4 BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1 **Præparater**

1.4.1.1 *Celler*

Der kan benyttes en række forskellige cellelinjer, stammer og primære cellekulturer, herunder humane celler (f.eks. fibroblaster fra kinesisk hamster eller perifere blodlymfocytter fra det perifere blod hos mennesker eller andre pattedyr).

1.4.1.2 *Substrater og dyrkningsforhold*

Til vedligeholdelse af kulturerne benyttes der egnede dyrkningssubstrater og inkuberingsbetingelser (dyrkningsflasker, CO_2-koncentration, temperatur og luftfugtighed). Etablerede cellelinjer og stammer kontrolleres regelmæssigt for stabilt karakteristisk kromosomtal og mycoplasmakontaminering; i tilfælde af kontaminering anvendes kulturen ikke. Cellernes normale cyklustid og dyrkningsbetingelserne skal være kendt.

1.4.1.3 *Fremstilling af kulturer*

Etablerede cellelinjer og stammer: celler udtages fra stamkulturer og udsås i dyrkningssubstrat med en sådan tæthed, at kulturerne ikke flyder sammen inden høst, og inkuberes ved 37°C.

Lymfocytter: fuldblod, der er behandlet med antikoaguleringsmiddel (f.eks. heparin), eller lymfocytter fra sunde individer tilsættes til dyrkningssubstratet, der indeholder et mitogen (f.eks. phytohæmagglutinin), og inkuberes ved 37°C.

1.4.1.4 *Metabolismeaktivering*

Cellerne udsættes for teststoffet både med og uden et egnet metabolismeaktiveringssystem. Det mest almindeligt anvendte system er en cofaktorsuppleret postmitokondriefraktion (S9), der fremstilles af levere fra rotter, der har været behandlet med enzyminducerende stoffer såsom Aroclor 1254 (6)(7)(8)(9), eller en blanding af phenobarbiton og β-naphthoflavon (109(11)(12).

Postmitokondriefraktionen anvendes normalt i en koncentration på 1-10 % (v/v) i det færdige testsubstrat. Et metabolismeaktiveringssystems beskaffenhed kan afhænge af, hvilken kemisk klasse teststoffet tilhører. I nogle tilfælde vil det være hensigtsmæssigt at benytte postmitokondriefraktion i mere end én koncentration.

Nogle udviklingstendenser, f.eks. genetisk konstruktion af cellelinjer, der udtrykker specifikke aktiverende enzymer, kan rumme potentiale for endogen aktivering. Valget af en bestemt cellelinje skal begrundes sagligt (f.eks. ved, at cytochrom P450-coenzymet er relevant for teststoffets metabolisme).

1.4.1.5 *Teststof/testpræparat*

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærere og fortyndes passende inden behandling af cellerne. Teststoffer i væskeform kan enten tilsættes direkte til testsystemet eller fortyndes inden behandlingen. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

1.4.2 **Testbetingelser**

1.4.2.1 *Opløsningsmiddel/bærer*

Der må ikke være mistanke om, at opløsningsmiddel/bærer reagerer kemisk med teststoffet, og opløsningsmiddel/bærer må hverken hæmme cellernes overlevelse eller S9-aktiviteten. Benyttes der andre opløsningsmidler/bærere end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærersystem. Ved undersøgelse af stoffer, der er ustabile i vand, skal de organiske opløsningsmidler være vandfrie. Vand kan fjernes ved tilsætning af molekylsi.

1.4.2.2 *Eksponeringskoncentrationer*

Stoffets cytotoksicitet, dets opløselighed i testsystemet samt ændringer i pH og osmolalitet er blandt de kriterier, der skal tages hensyn til ved valg af højeste koncentration.

Cytotoksiciteten bestemmes med og uden metabolismeaktivering i hovedforsøget ved hjælp af en passende indikator for celleintegritet og -vækst, f.eks. sammenflydningsgrad, antal levedygtige celler eller mitoseindeks. Der kan være hensigtsmæssigt at bestemme cytotoksicitet og opløselighed ved et indledende forsøg.

Der benyttes mindst 3 analyserbare koncentrationer. Hvis der er tale om cytotoksicitet, skal koncentrationerne dække et interval fra største toksicitet til ringe eller ingen toksicitet; det betyder normalt, at koncentrationerne højst er adskilt med en faktor mellem 2 og $\sqrt{10}$. På høsttidspunktet skal sammenflydning, celleantal eller mitoseindeks være faldet signifikant ved den højeste koncentration (mere end 50%). Mitoseindekset er kun et indirekte mål for cytotoksisk/cytostatisk virkning og afhænger af, hvor lang tid der er forløbet efter behandlingen. Mitoseindeks er dog acceptabel for dyrkning i rystekolber, hvor andre toksicitetsmål er besværlige eller ubrugelige i praksis. Oplysninger om cellecyklens kinetik, såsom den gennemsnitlige generationstid (AGT), kan benyttes som supplerende information. AGT er imidlertid et overordnet gennemsnit, der ikke altid afslører forsinkede subpopulationer, og selv en lille forøgelse af den gennemsnitlige generationstid kan føre til en meget betydelig forsinkelse af tidspunktet for optimalt udbytte af aberrationer.

For stoffer, der er forholdsvis ikke-cytotoksiske, må testkoncentrationen højst være 5 µl/ml, 5 mg/ml eller 0,01 M (den laveste af de tre).

For forholdsvis uopløselige stoffer, der ikke er toksiske ved koncentrationer under opløselighedsgrænsen, skal der som højeste dosis benyttes en koncentration, der er højere end opløselighedsgrænsen i det samlede dyrkningssubstrat ved behandlingens afslutning. I nogle tilfælde (f.eks. når toksicitet kun optræder over den laveste koncentration med uopløselighed) tilrådes det at gennemføre testen ved mere end én koncentration med synlig udfældning. Det kan være hensigtsmæssigt at bedømme opløseligheden både ved behandlingens begyndelse og afslutning, eftersom opløseligheden kan ændre sig under eksponeringen i testsystemet som følge af, at der er celler, S9, serum m.v. til stede. Uopløselighed kan iagttages med det blotte øje. Bundfald må ikke have indflydelse på bedømmelsen.

1.4.2.3 *Negative og positive kontrolprøver*

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærer) kontrolprøver, såvel med som uden metabolismeaktivering. Når der benyttes metabolismeaktivering, bør der som positivt kontrolkemikalie anvendes et, der kræver aktivering for at virke mutagent.

I positive kontrolprøver benyttes der et kendt clastogen i en mængde, der forventes at give reproducerbar og påviselig forøgelse i forhold til baggrundsværdierne, hvorved testsystemets følsomhed godtgøres.

Der vælges sådanne koncentrationer i de positive kontrolprøver, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede objektglas's identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser dem. Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolstoffer:

Metabolismeaktivering	Stof	CAS nr.	EINECS nr.
Ingen exogen metabolismeaktivering	Methylmethansulfonat	66-27-3	200-625-0
	Ethylmethansulfonat	62-50-0	200-536-7
	Ethylnitrosourea	759-73-9	212-072-2
	Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
	4–Nitroquinoline–*N*–oxid	56-57-5	200-281-1
Exogen metabolismeaktivering	Benzo[*a*]pyrene	50-32-8	200-028-5
	Cyclophosphamid	50-18-0	200-015-4
	Cyclophosphamid monohydrat	6055-19-2	

Der kan benyttes andre egnede stoffer til positiv kontrol. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer.

Der skal i hver høst indgå negative kontrolprøver, hvor behandlingsmediet kun består af opløsningsmiddel eller bærer, og som behandles på samme måde som de øvrige kulturer. Desuden skal der være ubehandlede kontrolprøver, medmindre der foreligger tidligere opnåede kontroldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

1.4.3 **Fremgangsmåde**

1.4.3.1 *Behandling med teststof*

Celler under formering behandles med teststoffet med og uden tilstedeværelse af et metabolismeaktiveringssystem. Behandling af lymfocytter påbegyndes ca. 2 døgn efter stimulering med mitogen.

1.4.3.2 Der benyttes normalt dobbeltbestemmelse ved hver koncentration, hvilket også stærkt tilrådes for negative kontrolprøver (kontrolprøver med opløsningsmiddel). Hvis det på grundlag af tidligere forsøg kan godtgøres, at forskellen mellem dobbeltbestemmelser (13)(14), er minimal, kan enkeltbestemmelse ved hver koncentration accepteres.

Gasformige og flygtige stoffer testes ved en egnet metode, f.eks. i forseglede dyrkningsflasker (15)(16).

1.4.3.3 *Høst af kulturer*

I det første forsøg udsættes cellerne for teststoffet både med og uden metabolismeaktivering i 3-6 timer, og der udtages prøve efter et tidsrum, der svarer til ca. 1,5 gange cellecykluslængden, regnet fra behandlingens begyndelse (12). Fører denne protokol til negativt resultat både med og uden aktivering, udføres endnu et forsøg, denne gang med kontinuerlig behandling indtil prøveudtagning efter et tidsrum, der svarer til ca. 1,5 gange en normal cellecyklus. Nogle kemiske stoffer er det lettere at bestemme ved behandlings/prøveudtagningstider på mere end 1,5 gange cellecyklussen. Negativt resultat med metabolismeaktivering skal bekræftes i hvert enkelt tilfælde. Anses bekræftelse af negative resultater ikke for nødvendige, skal dette begrundes.

1.4.3.4 *Kromosompræparering*

Cellekulturerne behandles med Colcemid® eller colchicin normalt 1-3 timer før høst. Høst og kromosompræparering skal foregå særskilt for hver enkelt kultur. Kromosompræpareringen består i hypotonisk behandling af cellerne, fiksering og farvning.

1.4.3.5 *Analyse*

Alle objektglas, herunder positive og negative kontrolprøver, kodes uafhængigt inden mikroskoperingen. Da fikseringen ofte medfører, at en del af metafasecellerne går i stykker og kromosomerne går tabt, bør bedømte celler indeholde et antal centromerer svarende til kromosomtallet ± 2 for alle celletyper. Der skal bedømmes mindst 200 vel fordelte metafaser pr. koncentration og kontrolgruppe, ligeligt fordelt mellem eventuelle dobbeltprøver. Dette antal kan sættes ned, hvis der iagttages høje aberrationstal.

Selv om testens formål er at påvise ændringer i kromosomstrukturen, er det vigtigt også at notere polyploidi og endofordobling, hvis dette konstateres.

2. **DATA**

2.1 BEHANDLING AF RESULTATER

Da cellen er forsøgets måleenhed, bedømmes det, hvilken procentdel af cellerne der har ændret kromosomstruktur. Forskellige strukturændringer noteres med antal og hyppighed for både forsøgs- og kontrolkulturer. Gaps noteres særskilt og registreres, men medregnes normalt ikke i den samlede aberrationshyppighed.

Sideløbende målinger af cytotoksicitet for alle behandlede og negative kontrolkulturer i hovedforsøget registreres ligeledes.

Dataene præsenteres for hver enkelt kultur. Desuden sammenfattes alle data i tabelform.

Der findes ingen krav til verifikation af et klart positivt resultat. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere undersøgelser, helst med ændrede forsøgsbetingelser. Der er redegjort for behovet for bekræftelse af negative resultater i punkt 1.4.3.3. Ved opfølgende forsøg kan man overveje at ændre på undersøgelsens parametre, så de bedømte forsøgsbetingelser udvides. Blandt de undersøgelsesparametre, der kan ændres på, er koncentrationernes spredning og metabolismeaktiveringen.

2.2 EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Der findes en række kriterier for opnåelse af et positivt resultat, f.eks. en koncentrationsafhængig forøgelse eller en reproducerbar forøgelse af antallet af celler med kromosomaberrationer. Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne (3)(13). Statistisk signifikans bør ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt.

En forøgelse i antallet af polyploide celler kan være tegn på, at teststoffet er i stand til at inhibere mitoseprocesser og fremkalde kromosomantalsafvigelser. En forøgelse af antallet af celler med endofordoblede kromosomer kan være tegn på, at teststoffet kan inhibere cellecyklussens forløb (17)(18).

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagent i dette system.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en in vitro-test for kromosomaberrationer viser, at teststoffet fremkalder ændringer i kromosomstrukturen i dyrkede somatiske celler fra pattedyr. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke fremkalder ændringer i kromosomstrukturen i dyrkede somatiske celler fra pattedyr.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærer

- begrundelse for valg af bærer
- teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærer, hvis den kendes

Celler

- celletype og -kilde
- den valgte celletypes karyotypiske karakteristika og egnethed
- eventuelt fravær af mycoplasma
- oplysninger om cellecyklussens længde
- bloddonorers køn, fuldblod eller fraseparerede lymfocytter samt benyttet mitogen
- eventuelt antal passager
- eventuelle metoder til vedligehold af cellekultur
- normalt kromosomtal

Testbetingelser

- det metafasestandsende stofs betegnelse og koncentration og længden af cellernes udsættelse for stoffet
- begrundelse for valg af koncentrationer og antal kulturer, herunder f.eks. eventuelle cytotoksicitetsdata og opløselighedsbegrænsninger
- substratsammensætning og eventuel CO_2-koncentration
- teststoffets koncentration
- volumen af tilsat bærer og teststof
- inkuberingstemperatur
- inkuberingstid
- behandlingens varighed
- celletæthed ved udsåning, hvis det er relevant
- metabolismeaktiveringssystemets type og sammensætning, herunder acceptkriterier
- positive og negative kontrolprøver
- metoder til præparering af objektglas
- kriterier for bedømmelse af aberrationer
- antal analyserede metafaser
- metoder til måling af toksicitet
- kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

Resultater

- tegn på toksicitet, f.eks. sammenflydningsgrad, cellecyklusdata, celletælling og mitoseindeks
- tegn på udfældning
- data om pH og osmolalitet i behandlingsmediet, hvis disse værdier er målt
- definitioner af aberrationer, herunder gaps
- antal celler med kromosomaberrationer og typen af disse, anført særskilt for hver behandlet kultur og kontrolkultur
- eventuel iagttaget ændring i ploidigrad
- dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt
- eventuelle statistiske analyser
- data for sideløbende negative (opløsningsmiddel/bærer) og positive kontrolprøver
- data for tidligere negative (opløsningsmiddel/bærer) og positive kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser.

Diskussion af resultaterne.

Konklusioner

4. REFERENCER

1. Evans, H.J. (1976). Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens. In: Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.

2. Ishidate, M.Jr. and Sofuni, T. (1985). The *in Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture. In: Progress in Mutation Research, Vol. 5, Ashby, J. et al., (Eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, 427-432.

3. Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G.H., Resnick, MA, Anderson, G. and Zeiger, E. (1978). Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. Environs. Molec. Mutagen 10 (suppl.10), 1-175.

4. 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.

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

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

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

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

9. Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66, 277-290.

10. Elliot, 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. Mutagenesis, 7, 175-177.

11. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds) *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85- 88.

12. Galloway, S.M., Aardema, M.J., Ishidate, M.Jr., Ivett, J.L., Kirkland, D.J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994). Report from Working Group on in *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312, 241-261.

13. Richardson, C., Williams, D.A., Allen, J.A., Amphlett, G., Chanter, D.O. and Phillips, B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

14. Soper, K.A. and Galloway, S.M. (1994). replicate Flasks are not Necessary for *In Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells. Mutation Res., 312, 139-149.

15. Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91-103.

16. 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. Environmental Mutagenesis, 5, 795-801.

17. Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. Mutation Res., 119, 403-413.

18. Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin - induced endoreduplication in Chinese hamster cells. Cancer Res., 43, 1362-1364.

B.11 MUTAGENICITET - IN VIVO-TEST FOR KROMOSOMABERRATIONER I KNOGLEMARV HOS PATTEDYR

1. METODE

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 475 "Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test" (1997).

1.1 INDLEDNING

In vitro-testen for kromosomaberrationer hos pattedyr benyttes til at påvise, om et teststof forårsager strukturelle kromosomafvigelser i knoglemarvceller hos dyr, normalt gnavere (1)(2)(3)(4). Der er to typer strukturændringer, kromosomtypen og kromatidtypen. Ploiditetsforøgelse kan være tegn på, at et kemisk stof er i stand til at fremkalde antalsafvigelser. De fleste kemiske mutagener forårsager ændringer af kromatidtypen, men også ændringer af kromosomtypen forekommer. Kromosommutationer og lignende er årsag til mange genetiske sygdomme hos mennesker, og meget tyder på, at kromosommutationer og lignende, som ændrer på onkogener og tumorsuppressorgener i somatiske celler, medvirker ved induktion af kræft hos mennesker og i forsøgssystemer.

Der benyttes rutinemæssigt gnavere i denne test. Knoglemarv er målvævet i denne test, da det er et væv med høj vaskularisation og består af celler med kort cyklustid, som er lette at isolere og behandle. Metoden omfatter ikke andre arter og væv.

Denne test for kromosomaberrationer er særlig relevant for en vurdering af risikoen for mutationsfremkaldelse, da den giver mulighed for at tage sådanne faktorer som in vivo-metabolisme, farmakokinetik og DNA-reparationsprocesser i betragtning, selv om de kan variere fra art til art og fra væv til væv. En in vivo-test er ligeledes nyttig til yderligere undersøgelse af mutagene virkninger, der er påvist ved en in vitro-test.

Hvis der er grund til at tro, at teststoffet eller en reaktiv metabolit ikke vil nå frem til målvævet, er denne test ikke egnet.

Se også den generelle indledning til afsnit B.

1.2 DEFINITIONER

Aberration af kromatidtypen: beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på enkeltkromatider eller brud på og sammenføjning af kromatider.

Aberration af kromosomtypen: beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på - eller brud på og sammenføjning af - begge kromatider på samme sted.

Endo-fordobling: en proces, hvorved cellekernen efter en S-fase i DNA-replikationen ikke fortsætter over i mitosen men påbegynder endnu en S-fase. Resultatet er kromosomer med 4, 8, 16, ... kromatider.

Gap: en akromatisk beskadigelse, som er mindre end ét kromatid bred, og hvor misalignment af kromatiderne er minimal.

Antalsafvigelse: ændring i kromosomtallet i forhold til det for de pågældende celler normale antal.

Polyploidi: et multiplum af det haploide kromosomtal (n), som ikke er det diploide tal (dvs. 3n, 4n, osv.).

Strukturel ændring: ændring i kromosomstrukturen, som kan iagttages ved mikroskopi i celledelingens metafase i form af deletioner og fragmenter, intrachange og interchange.

1.3 TESTMETODENS PRINCIP

Dyrene udsættes for teststoffet på passende måde og aflives efter passende tidsrum efter eksponeringen. Inden aflivningen behandles dyrene med et metafasestandsende stof (f.eks. colchicin eller Colcemid®). Der fremstilles derefter præparater af knoglemarvceller, som farves, og metafasecellerne undersøges for kromosomaberrationer.

1.4 BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1 **Præparater**

1.4.1.1 *Valg af dyreart*

Der benyttes sædvanligvis rotter, mus og kinesiske hamstere, selv om andre egnede pattedyrarter kan benyttes. Der bør anvendes almindeligt brugte laboratoriestammer af unge sunde voksne dyr. Ved undersøgelsens begyndelse bør vægtvariationen mellem dyrene være mindst mulig og ikke over ± 20% af gennemsnitsvægten for hvert køn.

1.4.1.2 *Miljø og fodring*

Der gælder de almindelige forhold som beskrevet i den generelle indledning til afsnit B, blot bør der tilstræbes en fugtighed på 50-60%.

1.4.1.3 *Forberedelse af dyrene*

Der udvælges tilfældigt sunde unge voksne dyr til kontrol- og behandlingsgruppen. Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning. Dyrene identificeres entydigt. Dyrene tilvænnes til laboratorieforholdene i mindst 5 dage.

1.4.1.4 *Fremstilling af doser*

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærere og fortyndes passende, inden de gives til dyrene. Teststoffer i væskeform kan enten gives direkte til dyrene eller fortyndes først. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

1.4.2 **Testbetingelser**

1.4.2.1 *Opløsningsmiddel/bærer*

Opløsningsmiddel/bærer må ikke have toksiske virkninger ved de benyttede doser og må ikke mistænkes for at reagere kemisk med teststoffet. Benyttes der andre opløsningsmidler/bærere end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærersystem.

1.4.2.2 *Kontrolgrupper*

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærer) kontrolgrupper af begge køn. Bortset fra behandling med teststof skal dyrene i kontrolgrupperne behandles på samme måde som dyrene i behandlingsgrupperne.

Positive kontrolprøver skal frembringe strukturelle ændringer in vivo ved en dosis, der forventes at give en påviselig forøgelse i forhold til baggrundsværdierne. Der vælges sådanne doser i de positive kontrolprøver, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede objektglas's identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser dem. Det kan accepteres, at den positive kontrol indgives på anden måde end teststoffet, og at der kun foretages én prøveudtagning. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer. Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolstoffer:

Stof	**CAS nr.**	**EINECS nr.**
Ethylmethansulfonat	62-50-0	200-536-7
Ethylnitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Cyclophosphamid Cyclophosphamid monohydrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Triethylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Der skal ved hver prøveudtagning indgå negative kontrolgrupper, som kun er behandlet med opløsningsmiddel eller bærer, og ellers behandlet på samme måde som behandlingsgrupperne, medmindre tidligere kontroldata har vist en acceptabel variation mellem dyr og hyppighed af celler med kromosomafvigelser. Hvis der kun udtages én negativ kontrolprøve, er det mest hensigtsmæssigt at gøre det ved første prøveudtagning. Desuden skal der være ubehandlede kontrolgrupper, medmindre der foreligger tidligere opnåede eller offentliggjorte kontroldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel/bærer ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

1.5 FREMGANGSMÅDE

1.5.1 **Dyrenes antal og køn**

Hver behandlet gruppe og kontrolgruppe skal bestå af mindst 5 analyserbare dyr af hvert køn. Hvis der på det tidspunkt, hvor undersøgelsen foretages, foreligger data fra undersøgelser med samme dyreart og med samme indgiftsmåde, som viser, at der ikke er nogen væsentlig toksicitetsforskel mellem de to køn, er test med kun ét køn tilstrækkeligt. Hvis udsættelsen af mennesker for det kemiske stof er kønsspecifik, som det f.eks. er tilfældet med visse farmaceutiske stoffer, skal testen udføres med dyr af det pågældende køn.

1.5.2 **Behandlingsplan**

Teststofferne indgives fortrinsvis i en enkelt dosis. De kan også indgives i to deldoser, dvs. to behandlinger samme dag med kun nogle få timers interval, hvorved det bliver lettere at indgive et større materialevolumen. Indgift på anden måde skal begrundes sagligt.

Der udtages prøver på to tidspunkter efter endagsbehandling. For gnavere udtages første prøve normalt 1,5 normal cellecykluslængde (som normalt er 12-18 timer) efter behandlingen. Da det optimale tidspunkt for påvisning af kromosomaberrationer kan afhænge af, hvor lang tid der er påkrævet for optagelse og metabolisme af teststoffet, og af teststoffets indvirkning på cellecyklussens kinetik, anbefales det at udtage endnu en prøve 24 timer efter den første. Indgives stoffet over mere end én dag, udtages der blot én prøve, når der er gået 1,5 normal cellecykluslængde efter den sidste behandling.

Inden aflivningen gives dyrene en intraperitoneal injektion med en passende dosis metafasestandsende stof (f.eks. Colcemid® eller colchicin). Der udtages prøver af forsøgsdyrene efter et passende tidsrum. For mus er dette tidsrum ca. 3-5 timer, for kinesisk hamster ca. 4-5 timer. Cellerne høstes fra knoglemarven og analyseres for kromosomaberrationer.

1.5.3 **Dosisniveauer**

Hvis der gennemføres en forprøve til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger nogen egnede data, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme, køn og behandlingsmåde som agtes benyttet i hovedundersøgelsen (5). Er der tale om toksicitet, benyttes der tre dosisniveauer for første prøveudtagningstidspunkt. Disse dosisniveauer skal dække et interval fra maksimal toksicitet til næsten ingen eller ingen toksicitet. Ved den efterfølgende prøveudtagning behøves kun den højeste dosis benyttet. Den højeste dosis defineres som den dosis, der fremkalder sådanne tegn på toksicitet, at højere dosis med samme indgiftsmønster må forventes at medføre død. Stoffer med specifik biologisk aktivitet ved lav ikke-toksisk dosis (f.eks. hormoner og mitogener) kan danne undtagelser fra disse dosisfastsættelseskriterier og bør evalueres individuelt. Højeste dosis kan også defineres som en dosis, der i nogen grad udviser tegn på toksicitet i knoglemarven (f.eks. mitoseindeks nedsat med mere end 50%).

1.5.4 **Grænsetest**

Hvis der ved en test med én dosis på mindst 2000 mg/kg legemsvægt indgivet på én gang eller i to omgange samme dag ikke kan iagttages nogen toksiske virkninger, og hvis man på grundlag af data om strukturmæssigt beslægtede stoffer ikke forventer gentoksicitet, kan en fuldstændig undersøgelse med tre dosisniveauer anses for unødvendig. For længerevarende undersøgelser er grænsedosis på 2000 mg pr. kg legemsvægt pr. dag for behandlinger over højst 14 dage og på 1000 mg pr. kg legemsvægt pr. dag for behandlinger over mere end 14 dage. Den forventede eksponering af mennesker kan foranledige, at der benyttes en højere dosis i grænsetesten.

1.5.5 **Indgift af doser**

Teststoffet indgives normalt ved tvangsfodring med sonde eller en passende intubationskanyle eller ved intraperitoneal injektion. Andre indgiftsmåder kan accepteres, hvis de kan begrundes. Hvor stor en væskemængde der kan indgives ad gangen ved tvangsfodring eller injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Mængden bør højst være på 2 ml pr. 100 g legemsvægt. Anvendelse af større rumfang skal begrundes. Bortset fra lokalirriterende og ætsende stoffer, som normalt vil have kraftigere virkninger ved højere koncentrationer, bør testvolumenet variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så volumenet bliver det samme ved alle dosisniveauer.

1.5.6 **Præparering af kromosomer**

Umiddelbart efter aflivningen udtages knoglemarven, som udsættes for hypotonisk væske og fikseres. Derefter stryges cellerne ud på objektglas og farves.

1.5.7 **Analyse**

Mitoseindekset bestemmes som udtryk for cytotoksiciteten i mindst 1000 celler pr. dyr for alle behandlede dyr (inkl. positive kontroldyr) og ubehandlede (negative) kontroldyr.

For hvert dyr bør mindst 100 celler analyseres. Dette antal kan sættes ned, hvis der iagttages et stort antal aberrationer. Alle objektglas, herunder positive og negative kontrolprøver, kodes uafhængigt inden mikroskoperingen. Da præpareringen af objektglas ofte medfører, at en del af metafasecellerne går i stykker og kromosomerne går tabt, bør bedømte celler indeholde et antal centromerer svarende til kromosomtallet 2n ± 2.

2. DATA

2.1 BEHANDLING AF RESULTATER

Data for de enkelte dyr præsenteres i tabelform. Forsøgsenheden er et dyr. For hvert dyr registreres antallet af bedømte celler, antallet af aberrationer pr. celle og den procentdel af cellerne, der har kromosomaberrationer. Forskellige typer strukturelle kromosomændringer skal anføres med antal og hyppighed for behandlingsgrupper og kontrolgrupper. Gaps registreres særskilt og oplyses, men medregnes ikke generelt i den totale aberrationshyppighed. Hvis der ikke er tegn på forskellig reaktion hos de to køn, kan dataene samles med henblik på statistisk analyse.

2.2 EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Der findes en række kriterier for afgøre, om et resultat er positivt, f.eks. en dosisafhængig forøgelse af andelen af celler med kromosomaberrationer eller en tydelig forøgelse af antallet af celler med aberrationer hos en enkeltdosisgruppe på et bestemt prøveudtagningstidspunkt. Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne (6). Statistisk signifikans bør ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere test, helst med ændring af forsøgsbetingelserne.

En forøgelse af ploiditetsgraden kan være tegn på, at teststoffet er i stand til at fremkalde kromosomantalsafvigelser. En forøget endofordobling kan være tegn på, at teststoffet kan inhibere cellecyklussens forløb (7)(8).

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagent i dette system.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en in vivo-test for kromosomaberrationer viser, at teststoffet fremkalder kromosomaberrationer i knoglemarven hos den undersøgte art. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke fremkalder kromosomaberrationer i knoglemarven hos den undersøgte art.

Sandsynligheden for, at teststoffet eller dets metabolitter når frem til det almindelige kredsløb eller specifikt til målvævet (f.eks. systemisk toksicitet), bør diskuteres.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærer

- begrundelse for valg af bærer
- teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærer, hvis den kendes

Forsøgsdyr

- anvendt art/stamme
- antal dyr samt deres alder og køn
- oprindelse, miljø, føde, mv.
- de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse, samt interval, gennemsnit og standardafvigelse for legemsvægten for hver enkelt gruppe

Testbetingelser

- positive og negative (bærer/opløsningsmiddel) kontrolgrupper
- data fra en eventuel forprøve til bestemmelse af dosisinterval
- begrundelse for valg af dosisniveau
- detaljerede oplysninger om præparering af teststoffet
- detaljerede oplysninger om indgift af teststoffet
- begrundelse for indgiftsvej
- eventuelle metoder til kontrol af, at teststoffet er nået frem til det almindelige kredsløb eller målvævet
- eventuel omregning fra teststofkoncentration (ppm) i føde/drikkevand til faktisk dosis (mg pr. kg legemsvægt pr. dag)
- detaljerede oplysninger om føde- og vandkvalitet
- detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøveudtagningsplan
- metoder til måling af toksicitet
- det metafasestandsende stofs betegnelse og koncentration og behandlingens varighed
- metoder til præparering af objektglas
- kriterier for bedømmelse af aberrationer
- antal analyserede celler pr. dyr
- kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

Resultater

- tegn på toksicitet
- mitoseindeks
- antal aberrationer og type, anført særskilt for hvert dyr
- samlet antal aberrationer pr. gruppe med gennemsnit og standardafvigelse
- antal celler med aberrationer pr. gruppe med gennemsnit og standardafvigelse
- eventuel iagttaget ændring i ploiditetsgrad
- dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt
- eventuelle statistiske analyser
- data for sideløbende negative kontrolprøver
- data for tidligere negative kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser
- data for sideløbende positive kontrolprøver.

Diskussion af resultaterne.

Konklusioner

4. REFERENCER

1. Adler, I.D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. S. Venitt and J.M. Parry (Eds). IRL Press, Oxford, Washington D.C., pp. 275-306.

2. Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A.F. and Shelby, M. (1987). Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. Mutation Res., 189, 157-165.

3. Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D.G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

4. Tice, R.R., Hayashi, M., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Holden, H.E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F.B., Pacchierotti, F., Preston, R.J., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). Report from the Working Group on the *in Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. Mutation Res., 312, 305-312.

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

6. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. D.J. Kirkland, (Ed.) Cambridge University Press, Cambridge. pp. 184-232.

7. Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. Mutation Res. 119, 403-413.

8. Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin - induced endoreduplication in Chinese hamster cells. Cancer Res., 43, 1362-1364.

B.12 MUTAGENICITET - IN VIVO-TEST FOR MIKROKERNER I ERYTHROCYTTER HOS PATTEDYR

1. METODE

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 474 "Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test" (1997).

1.1 INDLEDNING

In vivo-testen for mikrokerner hos pattedyr benyttes til påvisning af skader, som teststoffet har forvoldt på kromosomer eller mitoseapparatet i erythroblaster, ved analyse af erythrocytter i prøver fra knoglemarv og/eller det perifere blod hos dyr, sædvanligvis gnavere.

Formålet med mikrokernetesten er at påvise stoffer, der forvolder cytogenetiske skader, som medfører dannelse af mikrokerner indeholdende tiloversblevne kromosomfragmenter eller hele kromosomer.

Når en erythroblast i knoglemarven udvikler sig til en polykromatisk erythrocyt, udstødes cellekernen, og en eventuelt dannet mikrokerne kan blive tilbage i det ellers kernefri cytoplasma. I disse celler er mikrokerner let synlige, da de ellers ikke har nogen kerne. Forøget forekomst af polykromatiske erythrocytter med mikrokerne hos behandlede dyr er tegn på inducerede kromosomskader.

I denne test benyttes der rutinemæssigt knoglemarv hos gnavere, da der i dette væv produceres polykromatiske erythrocytter. Måling af umodne (polykromatiske) erythrocytter med mikrokerne i det perifere blod kan også accepteres i andre arter, hvor det er vist, at milten ikke kan fjerne erythrocytter med mikrokerner, eller at deres følsomhed over for stoffer, der forårsager strukturelle eller antalsmæssige kromosomaberrationer, er tilstrækkelig. Mikrokerner kan genkendes på en række kriterier, bl.a. om der er en DNA-centromer til stede. Det vigtigste endpoint er hyppigheden af umodne (polykromatiske) erythrocytter med mikrokerne. Det antal modne (normokromatiske) erythrocytter i det perifere blod, som indeholder mikrokerner, ud af et givet antal modne erythrocytter kan også benyttes som endpoint for testen, når dyrene behandles kontinuerligt i mindst 4 uger.

Denne in vivo-test for mikrokerner hos pattedyr er særlig relevant for vurdering af den reelle mutagenicitetsfare, idet den tager højde for sådanne faktorer som in vivo-metabolisme, farmakokinetik og DNA-reparationsprocesser, selv om disse kan variere fra art til art, væv til væv og genetisk endpoint til genetisk endpoint. En in vivo-test er ligeledes nyttig til yderligere undersøgelse af mutagene virkninger, der er påvist ved en in vitro-test.

Hvis der er grund til at tro, at teststoffet eller en reaktiv metabolit ikke vil nå frem til målvævet, er denne test ikke egnet.

Se også den generelle indledning til afsnit B.

1.2 DEFINITIONER

Centromer: region(er) af et kromosom, hvortil tentrådene er påhæftet under celledeling, således at datterkromosomerne kan ordnes i forhold til dattercellernes poler.

Mikrokerner: små ekstrakerner, der er adskilt fra cellens hovedkerne, og som dannes under mitosens telofase (meiose) ud fra efterladte kromosomfragmenter eller hele kromosomer.

Normokromatisk erythrocyt: moden erythrocyt, der mangler ribosomer og kan skelnes fra umodne polykromatiske erythrocytter ved ribosomselektiv farvning.

Polykromatisk erythrocyt: umoden erythrocyt på et udviklingsmellemstadium, som stadig indeholder ribosomer og derfor kan skelnes fra modne normokromatiske erythrocytter ved ribosomselektiv farvning.

1.3 TESTMETODENS PRINCIP

Dyrene udsættes for teststoffet på passende måde. Hvis der benyttes knoglemarv, aflives dyrene på et passende tidspunkt efter behandlingen, hvorefter knoglemarven udtages, og der fremstilles præparater og farves (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7). Hvis der benyttes perifert blod, tages der blodprøver på et passende tidspunkt efter behandlingen, hvorefter der fremstilles udstrygningspræparater og farves (4)(8)(9)(10).I undersøgelser med perifert blod bør der gå så kort tid som muligt mellem sidste eksponering og cellehøst. Præparaterne analyseres for tilstedeværelse af mikrokerner.

1.4 BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1 **Præparater**

1.4.1.1 *Valg af dyreart*

Der anbefales mus eller rotter, hvis der bruges knoglemarv, selv om andre egnede pattedyrarter kan benyttes. Bruges der perifert blod, anbefales mus. Dog kan enhver egnet pattedyrart benyttes, hvis dens milt ikke kan fjerne erythrocytter med mikrokerne, eller hvis den er vist at være tilstrækkelig følsom til at påvise stoffer, der forårsager strukturelle eller antalsmæssige kromosomaberrationer. Der bør anvendes almindeligt brugte laboratoriestammer af unge sunde dyr. Ved undersøgelsens begyndelse bør vægtvariationen mellem dyrene være mindst mulig og ikke over ± 20% af gennemsnitsvægten for hvert køn.

1.4.1.2 *Miljø og fodring*

Der gælder de almindelige forhold som beskrevet i den generelle indledning til afsnit B, blot bør der tilstræbes en fugtighed på 50-60%.

1.4.1.3 *Forberedelse af dyrene*

Der udvælges tilfældigt unge sunde voksne dyr til kontrol- og behandlingsgruppen. Dyrene identificeres entydigt. Dyrene tilvænnes til laboratorieforholdene i mindst 5 dage. Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning.

1.4.1.4 *Fremstilling af doser*

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærere og fortyndes passende, inden de gives til dyrene. Teststoffer i væskeform kan enten gives direkte til dyrene eller fortyndes først. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

1.4.2 **Testbetingelser**

1.4.2.1 *Opløsningsmiddel/bærer*

Opløsningsmiddel/bærer må ikke have toksiske virkninger ved de benyttede doser og må ikke mistænkes for at reagere kemisk med teststoffet. Benyttes der andre opløsningsmidler/bærere end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærersystem.

1.4.2.2 *Kontrolgrupper*

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærer) kontrolgrupper af begge køn. Bortset fra behandling med teststof skal dyrene i kontrolgrupperne behandles på samme måde som dyrene i behandlingsgrupperne.

Positive kontrolprøver skal frembringe mikrokerner in vivo ved en dosis, der forventes at give en påviselig forøgelse i forhold til baggrundsværdierne. Der vælges sådanne doser i de positive kontrolprøver, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede objektglas's identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser dem. Det kan accepteres, at den positive kontrol indgives på anden måde end teststoffet, og at der kun foretages én prøveudtagning. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer. Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolstoffer:

Stof	**CAS nr.**	**EINECS nr.**
Ethylmethansulfonat	62-50-0	200-536-7
N-ethyl-*N*-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Cyclophosphamid Cyclophosphamid monohydrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Triethylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Der skal ved hver prøveudtagning indgå negative kontroldyr, som kun er behandlet med opløsningsmiddel eller bærer, og ellers behandlet på samme måde som behandlingsgrupperne, medmindre tidligere kontroldata har vist en acceptabel variation mellem dyr indbyrdes og acceptabel hyppighed af celler med mikrokerner. Hvis der kun udtages én negativ kontrolprøve, er det mest hensigtsmæssigt at gøre det ved første prøveudtagning. Desuden skal der være ubehandlede kontrolgrupper, medmindre der foreligger tidligere opnåede eller offentliggjorte kontroldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

Hvis der benyttes perifert blod, kan en forbehandlingsprøve også accepteres som sideløbende negativ kontrolprøve, men kun i de korte undersøgelser (f.eks. 1-3 behandlinger), når de opnåede resultater ligger inden for det forventede interval for den forudgående kontrolprøve.

1.5 FREMGANGSMÅDE

1.5.1 **Dyrenes antal og køn**

Hver behandlet gruppe og kontrolgruppe skal bestå af mindst 5 analyserbare dyr af hvert køn (11) . Hvis der på det tidspunkt, hvor undersøgelsen foretages, foreligger data fra undersøgelser med samme dyreart og med samme indgiftsmåde, som viser, at der ikke er nogen væsentlig toksicitetsforskel mellem de to køn, er test med kun ét køn tilstrækkeligt. Hvis udsættelsen af mennesker for det kemiske stof er kønsspecifik, som det f.eks. er tilfældet med visse farmaceutiske stoffer, skal testen udføres med dyr af det pågældende køn.

1.5.2 **Behandlingsplan**

Der kan ikke anbefales nogen standardbehandlingsplan (dvs. 1, 2 eller flere behandlinger med 24 timers mellemrum). Prøver fra længerevarende indgiftsplaner er acceptable, når blot der i undersøgelsen er påvist en positiv virkning eller - for en negativ undersøgelse - der er påvist toksicitet eller grænsedosis har været anvendt, og når indgiften er fortsat indtil prøveudtagningen. Prøvestoffet kan også indgives i to deldoser, dvs. to behandlinger samme dag med kun nogle få timers interval, hvorved det bliver lettere at indgive et større materialevolumen.

Testen kan udføres på følgende to måder:

a) Dyrene behandles med teststoffet én gang. Der udtages prøver af knoglemarv mindst to gange, første gang tidligst 24 timer efter behandlingen, med passende intervaller mellem prøverne, sidste prøve dog senest 48 timer efter behandlingen. Prøveudtagning tidligere end 24 timer efter behandlingen skal begrundes. Der udtages prøver af perifert blod mindst to gange, tidligst 36 timer efter behandlingen og med passende intervaller efter den første prøve, sidste prøve dog senest efter 72 timer. Når der i en prøve er konstateret positiv reaktion, er yderligere prøveudtagning ikke nødvendigt.

b) Benyttes der 2 eller flere daglige behandlinger (f.eks. to eller flere behandlinger med 24 timers mellemrum) udtages der for knoglemarvs vedkommende prøver én gang mellem 18 og 24 timer efter den sidste behandling, og for perifert blods vedkommende én gang mellem 36 og 48 timer efter den sidste behandling (12).

Derudover kan der udtages prøver på andre tidspunkter, hvis det er relevant.

1.5.3 **Dosisniveauer**

Hvis der gennemføres en forprøve til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger nogen egnede data, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme, køn og behandlingsmåde som agtes benyttet i hovedundersøgelsen (13). Er der tale om toksicitet, benyttes der tre dosisniveauer for første prøveudtagningstidspunkt. Disse dosisniveauer skal dække et interval fra maksimal toksicitet til næsten ingen eller ingen toksicitet. Ved den efterfølgende prøveudtagning behøves kun den højeste dosis benyttet. Den højeste dosis defineres som den dosis, der fremkalder sådanne tegn på toksicitet, at højere dosis med samme indgiftsmønster må forventes at medføre død. Stoffer med specifik biologisk aktivitet ved lav ikke-toksisk dosis (f.eks. hormoner og mitogener) kan danne undtagelser fra disse dosisfastsættelseskriterier og bør evalueres individuelt. Højeste dosis kan også defineres som en dosis, der i nogen grad udviser tegn på toksicitet i knoglemarven (f.eks. en nedsættelse af andelen af umodne erythrocytter i forhold til totale erythrocytter i knoglemarv eller perifert blod).

1.5.4 **Grænsetest**

Hvis der ved en test med én dosis på mindst 2000 mg pr. kg legemsvægt indgivet på én gang eller i to omgange samme dag ikke kan iagttages nogen toksiske virkninger, og hvis man på grundlag af data om strukturmæssigt beslægtede stoffer ikke forventer gentoksicitet, kan en fuldstændig undersøgelse med tre dosisniveauer anses for unødvendig. For længerevarende undersøgelser er grænsedosis på 2000 mg pr. kg legemsvægt pr. dag for behandlinger over højst 14 dage og på 1000 mg pr. kg legemsvægt pr. dag for behandlinger over mere end 14 dage. Den forventede eksponering af mennesker kan foranledige, at der benyttes en højere dosis i grænsetesten.

1.5.5 **Indgift af doser**

Teststoffet indgives normalt ved tvangsfodring med sonde eller en passende intubationskanyle eller ved intraperitoneal injektion. Andre indgiftsmåder kan accepteres, hvis de kan begrundes. Hvor stor en væskemængde der kan indgives ad gangen ved tvangsfodring eller injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Mængden bør højst være på 2 ml pr. 100 g legemsvægt. Anvendelse af større rumfang skal begrundes. Bortset fra lokalirriterende og ætsende stoffer, som normalt vil have kraftigere virkninger ved højere koncentrationer, bør testvolumenet variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så volumenet bliver det samme ved alle dosisniveauer.

1.5.6 **Præparering af knoglemarv/blod**

Knoglemarvceller udtages normalt fra lårben eller skinneben umiddelbart efter aflivningen. Sædvanligvis udtages cellerne fra lårben eller skinneben, hvorefter de præpareres og farves med velkendte metoder. Perifert blod udtages fra halevenen eller et andet egnet blodkar. Blodlegemerne farves straks supravitalt (8)(9)(10), eller der fremstilles udstrygningspræparater, der derefter farves. Ved at bruge en DNA-specifik farvning [f.eks. acridinorange eller Hoechst 33258 plus pyronin-Y (15)] kan man undgå nogle af de artifakter, der optræder ved ikke-DNA-specifik farvning. Denne fordel udelukker ikke, at der benyttes konventionelle farvestoffer (f.eks. Giemsa). Supplerende systemer [f.eks. cellulosekolonner til fjernelse af kerneindeholdende celler (16)] kan også benyttes, forudsat at de er påvist at fungere tilfredsstillende ved præparering af mikrokerner i laboratoriet.

1.5.7 **Analyse**

For hvert dyr bestemmes andelen af umodne erythrocytter i forhold til det samlede antal (umodne og modne) erythrocytter, idet der tælles mindst 200 erythrocytter i alt for knoglemarv og 1000 erythrocytter for perifert blod (17). Alle objektglas, herunder positive og negative kontrolprøver, kodes uafhængigt inden mikroskoperingen. For hvert dyr bedømmes mindst 2000 umodne erythrocytter for forekomst af umodne erythrocytter med mikrokerner. Der kan opnås yderligere information ved bedømmelse af modne erythrocytter for indhold af mikrokerner. Ved analyse af objektglas må andelen af umodne erythrocytter i forhold til totale erythrocytter ikke være mindre end 20% af kontrolværdien. Når dyrene behandles kontinuerligt i 4 uger eller derover, kan også mindst 2000 modne erythrocytter pr. dyr bedømmes for forekomst af mikrokerner. Systemer til automatisk analyse (billedanalyse og flow-cytometri af celleopslæmninger) er acceptable som alternativer til manuel evaluering, hvis de er behørigt begrundet og valideret.

2. **DATA**

2.1 BEHANDLING AF RESULTATER

Data for de enkelte dyr præsenteres i tabelform. Forsøgsenheden er et dyr. For hvert dyr registreres antallet af bedømte umodne erythrocytter, antallet af umodne erythrocytter med mikrokerne og antallet af umodne erythrocytter i forhold til det samlede antal erythrocytter. Hvis dyrene behandles kontinuerligt i mere end 4 uger, anføres også dataene for modne erythrocytter, hvis de foreligger. Andelen af umodne erythrocytter i forhold til totale erythrocytter oplyses for hvert dyr, og, hvis det skønnes hensigtsmæssigt, procentdelen af erythrocytter med mikrokerne. Hvis der ikke er tegn på forskellig reaktion hos de to køn, kan dataene samles med henblik på statistisk analyse.

2.2 EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Der findes en række kriterier for at afgøre, om et resultat er positivt, f.eks. en dosisafhængig forøgelse af antallet af celler med mikrokerner eller en tydelig forøgelse af antallet af celler med mikrokerner hos en enkeltdosisgruppe på et bestemt prøveudtagningstidspunkt. Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne (18)(19). Statistisk signifikans bør ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere test, helst med ændring af forsøgsbetingelserne.

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagent i dette system.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af mikrokernetesten viser, at teststoffet fremkalder mikrokerner, som følge af beskadigelse af kromosomer eller mitoseapparat hos erythroblaster i den undersøgte art. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke fremkalder mikrokerner hos umodne erythrocytter i den undersøgte art.

Sandsynligheden for, at teststoffet eller dets metabolitter når frem til det almindelige kredsløb eller specifikt til målvævet (f.eks. systemisk toksicitet), bør diskuteres.

3. RAPPORTERING

TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærer:

- begrundelse for valg af bærer
- teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærer, hvis den kendes

Forsøgsdyr:

- anvendt art/stamme
- antal dyr samt deres alder og køn
- oprindelse, miljø, føde, mv.
- de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse, samt interval, gennemsnit og standardafvigelse for legemsvægten for hver enkelt gruppe

Testbetingelser:

- positive og negative (bærer/opløsningsmiddel) kontrolgrupper
- data fra en eventuel forprøve til bestemmelse af dosisinterval
- begrundelse for valg af dosisniveau
- detaljerede oplysninger om præparering af teststoffet
- detaljerede oplysninger om indgift af teststoffet
- begrundelse for indgiftsvej
- eventuelle metoder til kontrol af, at teststoffet er nået frem til det almindelige kredsløb eller målvævet
- eventuel omregning fra teststofkoncentration (ppm) i føde/drikkevand til faktisk dosis (mg pr. kg legemsvægt pr. dag)
- detaljerede oplysninger om føde- og vandkvalitet
- detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøveudtagningsplan
- metoder til præparering af objektglas
- metoder til måling af toksicitet
- kriterier for bedømmelse af umodne erythrocytter med mikrokerner
- antal analyserede celler pr. dyr
- kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

Resultater

- tegn på toksicitet
- andel af umodne erythrocytter i forhold til total erythrocytter
- antal umodne erythrocytter med mikrokerner, anført særskilt for hvert dyr
- gennemsnit ± standardafvigelse for umodne erythrocytter med mikrokerner for hver gruppe
- dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt
- anvendte statistiske analyser og metoder
- data for sideløbende og tidligere negative kontrolprøver
- data for sideløbende positive kontrolprøver.

Diskussion af resultaterne.

Konklusioner

4. REFERENCER

1. Heddle, J.A. (1973). A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, Mutation Res., 18, 187-190.
2. Schmid, W. (1975). The Micronucleus Test, Mutation Res., 31, 9-15.
3. Heddle, J.A., Salamone, M.F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.G. and Newell, G.W. (1983). The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. Mutation Res. 123: 61-118.
4. Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F. and Heddle, J.A. (1990). The *In Vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 239, 29-80.
5. MacGregor, J.T., Schlegel, R. Choy, W.N., and Wehr, C.M. (1983). Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice. in: "Developments in Science and Practice of Toxicology", Ed. A.W. Hayes, R.C. Schnell and T.S. Miya, Elsevier, Amsterdam, 555-558.
6. MacGregor, J.T., Heddle, J.A. Hite, M., Margolin, G.H., Ramel, C., Salamone, M.F., Tice, R.R., and Wild, D. (1987) Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erytrocytes. Mutation Res. 189: 103-112.
7. MacGregor, J.T., Wehr, C.M., Henika, P.R., and Shelby, M.E. (1990). The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies. Fund. Appl. Toxicol. 14: 513-522.
8. Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990). The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides. Mutation Res., 245, 245-249.
9. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS. MMS. Mutation Res., 278, 83-98.

10. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS. MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan)(1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. Mutagenesis, 10, 153-159.

11. Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blackey, D.H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr.F.B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). *In Vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. Mutation Res., 312, 293-304.

12. Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995). An optimal, generalized sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test. Mutagenesis, 10, 313-319.

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

14. Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. Mutation Res., 120, 241-247.

15. MacGregor, J.T., Wehr, C.M. and Langlois, R.G. (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. Mutation Res., 120, 269-275.

16. Romagna, F. and Staniforth, C.D. (1989). The automated bone marrow micronucleus test. Mutation Res., 213, 91-104.

17. Gollapudi, B. and McFadden, L.G. (1995). Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. Mutation Res., 347, 97-99.

18. Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assay. In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I, revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

19. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

B.13/14 MUTAGENICITET - TILBAGEMUTATIONSTEST MED BAKTERIER

1. METODE

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 471 "Bacterial Reverse Mutation Test" (1997).

1.1 INDLEDNING

I tilbagemutationstesten med bakterier benyttes der aminosyrekrævende stammer af *Salmonella typhimurium* og *Escherichia coli* til at påvise punktmutationer med substitution, addition eller deletion af et eller nogle få DNA-basebar (1)(2)(3). Princippet i denne tilbagemutationstest med bakterier er, at den påviser mutationer, som tilbagemuterer mutationer i teststammerne og dermed sætter bakterien i stand til at syntetisere en essentiel aminosyre. Revertantbakterierne påvises ved deres evne til at vokse uden den aminosyre, som den oprindelige teststamme kræver.

Punktmutationer er årsagen til mange genetiske sygdomme hos mennesker, og der er meget der tyder på, at punktmutationer i onkogener og tumorsuppressorgener i somatiske celler spiller en rolle for dannelse af tumorer hos mennesker og i forsøgsdyr. Tilbagemutationstesten med bakterier er hurtig, billig og forholdsvis let at udføre. Mange teststammer har forskellige egenskaber, der gør dem mere følsomme til påvisning af mutationer, bl.a. responsive DNA-sekvenser på reversionsstedet, høj cellepermeabilitet for store molekyler og manglende DNA-reparationssystemer eller forstærkede fejlbehæftede DNA-reparationsprocesser. Teststammernes specificitet kan give nyttige oplysninger om, hvilke typer mutationer et gentoksisk stof inducerer. Der findes en meget stor database med resultater for en lang række strukturer med tilbagemutationstest med bakterier, og der er udviklet veletablerede metodologier for test af kemikalier med forskellige fysiske og kemiske egenskaber, herunder flygtige forbindelser.

Se også den generelle indledning til afsnit B.

1.2 DEFINITIONER

En **tilbagemutationstest** med enten *Salmonella typhimurium* eller *Escherichia coli* påviser mutation i en aminosyrekrævende stamme (histidin eller tryptophan) til en stamme, der er uafhængig af tilførsel af aminosyren udefra.

Mutagener for baseparsubstitution er stoffer, der forårsager en baseændring i DNA'et. I en tilbagemutationstest kan denne ændring ske samme sted som den oprindelige mutation eller et andet sted i bakteriens genom.

Læserammemutagener er stoffer, der medfører insertion eller deletion af et eller flere basepar i DNA'et, således at RNA'ets læseramme ændres.

1.3 INDLEDENDE OVERVEJELSER

I tilbagemutationstesten med bakterier benyttes der prokaroytiske celler, som adskiller sig fra pattedyrceller med hensyn til f.eks. optagelse, metabolisme, kromosomstruktur og DNA-reparationsprocesser. In vitro-test kræver normalt en exogen kilde til metabolismeaktivering. In vitro-metabolismeaktiveringssystemer kan ikke fuldstændig efterligne in vivo-forholdene i pattedyr. Testen vil derfor ikke give direkte oplysninger om et stofs mutagene og carcinogene potentiale i pattedyr.

Tilbagemutationstesten med bakterier anvendes generelt til en indledende screening for gentoksiske virkninger og, især, punktmutationsinducerende aktivitet. Det er ved hjælp af en omfattende database påvist, at mange kemiske stoffer, som giver positivt resultat i denne test, også har mutagen virkning i andre test. Der findes mutagene stoffer, der ikke er påvist ved denne test; årsagen hertil kan tilskrives det påviste endpoints specifikke karakter, forskelle i metabolismeaktivering og forskelle i biotilgængelighed. På den anden side kan faktorer, der øger tilbagemutationstestens følsomhed, føre til et for højt skøn over stoffets mutagene aktivitet.

Tilbagemutationstesten med bakterier kan være uegnet til evaluering af bestemte klasser af kemiske stoffer, f.eks. stærkt baktericide forbindelser (f.eks. visse antibiotika) og forbindelser, der antages (eller vides) at gribe specifikt ind i pattedyrcellers replikationssystem (f.eks. visse topoisomeraseinhibitorer og visse nucleosidanaloger). I sådanne tilfælde kan mutationstest i pattedyr være mere velegnede.

Selv om mange af de stoffer, der er positive i denne test, er kræftfremkaldende hos pattedyr, er korrelationen ikke fuldstændig. Den afhænger af den kemiske klasse, og der findes carcinogener, der ikke påvises ved denne test, fordi de virker via andre ikke-gentoksiske mekanismer eller mekanismer, der ikke findes i bakterieceller.

1.4 TESTMETODENS PRINCIP

Opslæmninger af bakterieceller udsættes for teststoffet med og uden et exogent metabolismeaktiveringssystem. Ved pladeinkorporeringsmetoden blandes disse opslæmninger med en topagar og hældes ud på et mimimal-substrat. Ved præinkubationsmetoden inkuberes behandlingsblandingen, hvorefter den blandes med topagar inden udhældning på minimalsubstrat. For begge metoders vedkommende tælles revertantkolonierne efter 2-3 dages inkubation, og der sammenlignes med antallet af spontane revertantkolonier på kontrolpladerne med opløsningsmiddel.

Der er beskrevet en række fremgangsmåder for udførelse af tilbagemutationstesten med bakterier. Blandt de mest almindeligt benyttede er pladeinkorporeringsmetoden (1)(2)(3)(4) præinkubationsmetoden (2)(3)(5)(6)(7)(8) fluktuationsmetoden, og suspensionsmetoden (11). Der er beskrevet modifikationer til test af gasser og dampe (12).

De i denne metode beskrevne fremgangsmåder vedrører især pladeinkorporeringsmetoden og præinkubationsmetoden. De er begge acceptable til udførelse af forsøgene både med og uden metabolismeaktivering. Nogle stoffer, bl.a. kortkædede alifatiske nitrosaminer, divalente metaller, aldehyder, azofarvestoffer og diazoforbindelser, pyrollizidinalkaloider, allylforbindelser og nitroforbindelser (3), kan mest effektivt påvises ved præinkubationsmetoden. Det er også kendt, at visse klasser af mutagener ikke altid påvises ved standardmetoder som f.eks. pladeinkorporeringsmetoden og præinkubationsmetoden. Sådanne tilfælde bør betragtes som "særtilfælde", og det anbefales kraftigt at anvende alternative metoder til påvisning i disse tilfælde. Følgende "særtilfælde" er konstateret (samt eksempler på fremgangsmåder, der kan benyttes til påvisning): azofarvestoffer og diazoforbindelser (3)(5)(6)(13), gasser og flygtige stoffer (12)(14)(15)(16) og glycosider (17)(18). Afvigelser fra standardmetoden skal begrundes sagligt.

1.5 BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.5.1 **Præparater**

1.5.1.1 *Bakterier*

Friske bakteriekulturer fremdyrkes til den sidste del af den eksponentielle fase eller til begyndelsen af den stationære fase (ca. 10^9 celler pr. ml). Kulturer sidst i den stationære fase bør ikke benyttes. Det er vigtigt, at de kulturer, der benyttes i forsøgene, har et højt indhold af levedygtige bakterier. Titeren kan godtgøres enten ved hjælp af tidligere kontroldata for vækstkurver eller ved bestemmelse af antallet af levedygtige celler i det enkelte forsøg ved udpladning.

Som inkubationstemperatur anbefales 37°C.

Der skal benyttes mindst 5 bakteriestammer, deriblandt 4 stammer af *S. typhimurium* (TA1535, TA98, TA100 samt TA1537, TA97a eller TA97), som er påvist at være pålidelige, og hvis respons er reproducerbar mellem laboratorier. Disse fire *S. typhimurium*-stammer har GC-basepar på de primære reversionssted, og det vides, at de ikke altid påviser visse oxiderende mutagener, tværbindende stoffer og hydraziner. Sådanne stoffer kan påvises med *E. coli* WP2-stammer eller *S. typhimurium* TA102 (19), som har AT-basepar på det primære reversionssted. Derfor kan følgende kombination af stammer anbefales:

- *S. typhimurium* TA1535
- *S. typhimurium* TA1537, TA97 eller TA97a
- *S. typhimurium* TA98
- *S. typhimurium* TA100
- *E. coli* WP2 uvrA, *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) eller *S. typhimurium* TA102

For at kunne påvise tværbindende mutagener kan det foretrækkes at vælge TA102 eller at tilføje en DNA-reparationsdygtig stamme af *E. coli* [f.eks. *E. coli* WP2 eller *E. coli* WP2 (pKM101)].

Der benyttes anerkendte metoder til stamkulturfremstilling, markørverifikation og opbevaring. For hver enkelt frosset kulturpræparat påvises den aminosyrebetingede vækst (histidin for *S. typhimurium*-stammer og tryptophan for E. coli-stammer). Andre fænotypiske egenskaber skal kontrolleres på lignende måde, således tilstedeværende eller manglende R-faktorplasmider, når det er relevant [dvs. ampicillinresistens hos TA98-stammen, TA100- og TA97a- eller TA97-stammen, WP2 uvrA-stammen og WP2 uvrA (pKM101)-stammen, samt ampicillin- og tetracyclinresistens hos TA102-stammen], tilstedeværelse af karakteristiske mutationer (dvs. rfa-mutation hos *S. typhimurium* ved hjælp af følsomhed over for krystalviolet og uvrA-mutation hos *E. coli* eller uvrB-mutation hos *S. typhimurium* ved hjælp af følsomhed over for ultraviolet lys)(2)(3). Stammerne skal ligeledes give kimtal for spontane revertanter inden for den hyppighed, der må forventes ud fra laboratoriets hidtidige kontroldata, og helst inden for den hyppighed, der er angivet i litteraturen.

1.5.1.2 *Substrat*

Der benyttes en egnet minimalager (f.eks. med Vogel-Bonner minimalsubstrat E og glucose) og en topagar med histidin og biotin eller tryptophan, så der tillades nogle få celledelinger (1)(2)(9).

1.5.1.3 *Metabolismeaktivering*

Bakterierne udsættes for teststoffet både med og uden et egnet metabolismeaktiveringssystem. Det mest almindeligt anvendte system er en cofaktorsuppleret postmitokondriefraktion (S9), der fremstilles af levere fra rotter, der har været behandlet med enzyminducerende stoffer såsom Aroclor 1254 (1)(2) eller en blanding af phenobarbiton og β-naphthoflavon (18)(20)(21). Postmitokondriefraktionen anvendes normalt i en koncentration på 5-30 % (v/v) i S9-blandingen. Valg af metabolismeaktiveringssystem og dets beskaffenhed kan afhænge af, hvilken kemisk klasse teststoffet tilhører. I nogle tilfælde vil det være hensigtsmæssigt at benytte postmitokondriefraktion i mere end én koncentration. For azofarvestoffer og diazoforbindelser kan et reduktivt metabolismeaktiveringssystem være mere velegnet (6)(13).

1.5.1.4 *Teststof/testpræparat*

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærere og fortyndes passende inden behandling af bakterierne. Teststoffer i væskeform kan enten tilsættes direkte til testsystemet eller fortyndes inden behandlingen. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

Der må ikke være mistanke om, at opløsningsmiddel/bærer reagerer kemisk med teststoffet, og opløsningsmiddel/bærer skal være kompatibel med bakteriernes overlevelse og S9-aktiviteten (22). Benyttes der andre opløsningsmidler/bærere end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærersystem. Ved undersøgelse af stoffer, der er ustabile i vand, skal de organiske opløsningsmidler være vandfrie.

1.5.2 **Testbetingelser**

1.5.2.1 *Teststammer (se punkt 1.5.1.1)*

1.5.2.2 *Eksponeringskoncentration*

Stoffets cytotoksicitet og dets opløselighed i den endelige testblanding er blandt de kriterier, der skal tages hensyn til ved valg af højeste koncentration.

Det kan være hensigtsmæssigt at bestemme toksicitet og opløselighed ved et indledende forsøg. Cytotoksicitet kan påvises ved et fald i antallet af revertantkolonier, ved en opklaring eller hæmning af baggrundsvæksten eller ved graden af overlevelse i de behandlede kulturer. Et stofs cytotoksicitet kan ændres ved, at der er metabolismeaktiveringssystemer til stede. Uopløselighed bedømmes ved, at der med det blotte øje kan iagttages udfældning i slutblandingen under de faktiske forsøgsbetingelser.

Der anbefales en maksimal testkoncentration af opløselige ikke-cytotoksiske stoffer på 5 mg/plade eller 5 µl/plade. For ikke-cytotoksiske stoffer, der ikke er opløselige med 5 mg/plade eller 5 µl/plade, skal en eller flere af de undersøgte koncentrationer være uopløselig i slutblandingen. Teststoffer, der er cytotoksiske allerede under 5 mg/plade eller 5 µl/plade, testes op til den cytotoksiske koncentration. Bundfald må ikke have indflydelse på bedømmelsen.

Der benyttes mindst 5 forskellige analyserbare koncentrationer af teststoffer med en afstand på ca. en halv logaritme (√10) mellem koncentrationerne i det indledende forsøg. Ved undersøgelse af en koncentration/respons-sammenhæng kan mindre intervaller være hensigtsmæssigt. Test ved koncentrationer over 5 mg/plade eller 5 µl/plade kan tages under overvejelse, når bedømmelsen vedrører stoffer med et betydeligt indhold af potentielt mutagene urenheder.

1.5.2.3 *Negative og positive kontrolprøver*

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærer) stammespecifikke kontrolprøver, såvel med som uden metabolismeaktivering. Der vælges en sådan koncentration i den positive kontrol, at det enkelte forsøgs effektivitet godtgøres.

Ved forsøg med metabolismeaktivering udvælges positive kontrolreferencestoffer ud fra den valgte type bakteriestamme.

Nedenfor er der eksempler på stoffer, som er egnede som positive kontrolstoffer i forsøg med metabolismeaktivering:

CA-nummer	EINECS-nummer	Navn
781-43-1	212-308-4	9,10-dimethylanthracen
57-97-6	200-359-5	7,12-dimethylbenz[*a*]anthracen
50-32-8	200-028-5	benzo[*a*]pyren
613-13-8	210-330-9	2-aminoanthracen
50-18-0	200-015-4	cyclophosphamid
6055-19-2		cyclophosphamidmonohydrat

Følgende stof er egnet som positivt kontrolstof ved reduktiv metabolismeaktivering:

573-58-0	209-358-4	Congo-rødt

2-aminoanthracen bør ikke anvendes som eneste indikator for, om S9-blandingen er effektiv. Hvis der benyttes 2-aminoanthracen, skal hver batch af S9 tillige karakteriseres med et mutagen, der kræver metabolisme-aktivering med mikrosomenzymer, f.eks. benzo[*a*]pyren eller dimethylbenzanthracen.

Nedenfor er der eksempler på stoffer til brug som stammespecifikke positive kontrolstoffer i forsøg uden exogen metabolismeaktivering:

CAS-nummer	EINECS-nummer	Navn	Stamme
26628-22-8	247-852-1	natriumazid	TA 1535 og TA 100
607-57-8	210-138-5	2-nitrofluoren	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-aminoacridin	TA 1537, TA 97 og TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 og TA 97a
80-15-9	201-254-7	cumenhydroperoxid	TA 102
50-07-7	200-008-6	mitomycin C	WP2 uvrA og TA102
70-25-7	200-730-1	*N*-ethyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidin	WP2, WP2uvrA og WP2uvrA(pKM101)
56-57-5	200-281-1	4-nitroquinolin-1-oxid	WP2, WP2uvrA og WP2uvrA(pKM101)
3688-53-7		furylfuramid (AF2)	plasmidholdige stammer

Der kan benyttes andre egnede referencestoffer til positiv kontrol. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer.

Der skal indgå negative kontrolprøver, der kun består af opløsningsmiddel eller bærer uden teststof, og som behandles på samme måde som de øvrige testgrupper. Desuden skal der være ubehandlede kontrolprøver, medmindre der foreligger tidligere opnåede kontroldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

1.5.3 **Fremgangsmåde**

Ved pladeinkorporeringsmetoden (1)(2)(3)(4) uden metabolismeaktivering blandes normalt 0,05 ml eller 0,1 ml testopløsning, 0,1 ml frisk bakteriekultur (indeholdende ca. 10^8 levedygtige celler) og 0,5 ml steril buffer med 2,0 ml topagar. Ved forsøg med metabolismeaktivering blandes normalt ca. 0,5 ml metabolismeaktiveringsblanding, indeholdende en passende mængde postmitokondriefraktion (5-30% (v/v) i metabolismeaktiveringsblandingen), med topagaren (2,0 ml), bakterierne og teststoffet/testopløsningen. Indholdet i de enkelte glas blandes og hældes ud over overfladen på en minimalagarplade. Topagaren henstilles til størkning inden inkubering.

Ved præinkubationsmetoden (2)(3)(5)(6) forinkuberes teststof/testopløsning sammen med teststammen (indeholdende ca. 10^8 levedygtige celler) og steril buffer eller metabolismeaktiveringssystemet (0,5 ml) normalt i 20 minutter ved 30-37°C, inden der blandes med topagaren og blandingen hældes ud på overfladen af en minimalagarplade. Normalt blandes 0,05 ml eller 0,1 ml teststof/testopløsning, 0,1 ml bakteriekultur og 0,5 ml S9-blanding eller steril buffer med 2,0 ml topagar. Glassene bør under forinkuberingen beluftes i rysteapparat.

Til forsvarlig bestemmelse af variationen udføres der tredobbelt udpladning ved hvert dosisniveau. Dobbelt udpladning kan accepteres, hvis den begrundes sagligt. Tab af en plade af og til gør ikke nødvendigvis testen ubrugelig.

Gasformige og flygtige stoffer testes ved en egnet metode, f.eks. i forseglede dyrkningsflasker (12)(14)(15)(16).

1.5.4 **Inkubering**

Alle plader i hvert forsøg inkuberes ved 37°C i 48-72 timer. Efter inkuberingen tælles antallet af revertantkolonier pr. plade.

2. DATA

2.1 BEHANDLING AF RESULTATER

Dataene forelægges som antallet af revertantkolonier pr. plade. Også antallet af revertantkolonier på både negative (opløsningsmiddelkontrol og en eventuel ubehandlet kontrol) og positive kontrolplader oplyses. Tallene for hver enkelt plade, gennemsnittet af revertantkolonier pr. plade og standardafvigelsen opgives for teststoffet og for positive og negative kontrolplader (ubehandlede og/eller med opløsningsmiddel).

Der findes ingen krav til verifikation af et klart positivt resultat. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere undersøgelser, helst med ændrede forsøgsbetingelser. Negative resultater bekræftes efter en vurdering af de enkelte tilfælde. Anses bekræftelse af negative resultater ikke for nødvendige, skal dette begrundes. Ved opfølgende forsøg kan man overveje at ændre på undersøgelsens parametre, så de bedømte forsøgsbetingelser udvides. Blandt de undersøgelsesparametre, der kan ændres på, er koncentrationernes spredning, behandlingsmetoden (pladeinkorporering eller væske-præinkubation) og metabolismeaktiveringen.

2.2 EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Der findes en række kriterier for, om der er opnået et positivt resultat, f.eks. en koncentrationsafhængig forøgelse af antallet af revertantkolonier pr. plade i det undersøgte interval og/eller en reproducerbar forøgelse af antallet af revertantkolonier pr. plade ved en eller flere koncentrationer, for mindst én stamme med eller uden metabolismeaktivering (23). Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne (24). Statistisk signifikans bør dog ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt.

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagent i denne test.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en tilbagemutationstest med bakterier viser, at teststoffet fremkalder punktmutationer ved basesubstitution eller læserammeforskydning i genomet hos *Salmonella typhimurium* og/eller *Escherichia coli.* Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke er mutagent i den undersøgte organisme.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærer:

- begrundelse for valg af bærer
- teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærer, hvis den kendes

Stammer:

- anvendte stammer
- antal celler pr. kultur
- karakteristika for stammen

Testbetingelser:

- mængde teststof pr. plade (mg/plade eller µl/plade) med begrundelse for valg af dosis og pladeantal pr. koncentration
- anvendte substrater
- metabolismeaktiveringssystemets type og sammensætning, herunder acceptkriterier
- behandlingsmetoder

Resultater:

- tegn på toksicitet
- tegn på udfældning
- kimtal for de enkelte plader
- gennemsnitligt antal revertantkolonier pr. plade og standardafvigelsen
- dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt
- eventuelle statistiske analyser
- data for sideløbende negative (opløsningsmiddel/bærer) og positive kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser
- data for tidligere negative (opløsningsmiddel/bærer) og positive kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser.

Diskussion af resultaterne.

Konklusioner

4. REFERENCER

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

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

3? Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994). Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. Mutation Res., 312, 217-233.

4? Kier, L.D., Brusick D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T.K. and Ray V. (1986). The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 168, 69-240.

5? Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975). Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, Cancer Letters, 1, 91-96.

6? Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980). Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests. In: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens. Ed. Norpoth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York. pp. 273-285.

7? Gatehouse, D.G., Rowland, I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. and Foster, R. (1980). Bacterial Mutation Assays. In: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised. Ed. D.J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.

8? Aeschacher, H.U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987). Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. J. Food Safety, 8, 167-177.

9? Green, M.H.L., Muriel, W.J. and Bridges, B.A. (1976). Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. Mutation Res., 38, 33-42.

10? Hubbard, S.A., Green, M.H.L., Gatehouse, D. and J.W. Bridges (1984). The Fluctuation Test in Bacteria. In: Handbook of Mutagenicity Test Procedures. 2nd Edition. Ed. Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.

11? Thompson, E.D. and Melampy, P.J. (1981). An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*. Environmental Mutagenesis, 3, 453-465.

12? Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994). Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag. Mutation Res., 307, 335-344.

13? Prival, M.J., Bell, S.J., Mitchell, V.D., Reipert, M.D. and Vaughn, V.L. (1984). Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay. Mutation Res., 136, 33-47.

14? Zeiger, E., Anderson, B.E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992). Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals. Environ. Mol. Mutagen., 19, 2-141.

15? Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R.G. (1977). Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water. In Progress in Genetic Toxicology, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (Eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.

16? Hughes, T.J., Simmons, D.M., Monteith, I.G. and Claxton, L.D. (1987). Vaporization Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay. Environmental Mutagenesis, 9, 421-441.

17? Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T. (1979). Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*. Cancer Res., 39, 3780-3782.

18? Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B.N. (1980). Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4961-4965.

19? Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D.J. and Gatehouse, D.G. (1990). Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains. Mutagenesis, 5, 285-291.

20? Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems. In: "*In Vitro* metabolic Activation in Mutagenesis Testing" Eds. F.J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.

21? Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, 175-177.

22? Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B.N. (1981). Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test. Mutation Res., 88 343-350.

23? Claxton, L.D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987). Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity. Mutation Res. 189, 83-91.

24? Mahon, G.A.T., Green, M.H.L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W.D. and Tweats, D.J. (1989). Analysis of Data from Microbial Colony Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Ed. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

B. 15

MUTAGENICITETSTESTNING OG SCREENING FOR KARCINOGENICITET

GENMUTATION — SACCHAROMYCES CEREVISIAE

1. **METODE**

1.1. **Indledning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. **Definitioner**

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. **Referencestoffer**

Ingen.

1.4. **Princip for testmetoden**

En række forskellige haploide og diploide stammer af gæren Saccharomyces cerevisiae kan anvendes ved undersøgelse af genmutationer, som induceres af kemiske stoffer med og uden metabolisk aktivering.

Man har anvendt fremadmutationssystemer med haploide stammer f.eks. ved bestemmelse af mutation fra røde, adeninafhængige mutanter (ade-1, ade-2) til dobbelt adeninafhængige hvide mutanter og selektive systemer som induktion af canavanin-resistens og cycloheximid-resistens.

Det bedst validerede tilbagemutationssystem bygger på anvendelse af den haploide stamme XV 185-14C, der er bærer af ochre nonsensemutationerne ade 2-1, arg 4-17, lys 1-1 og trp 5-48, og som muterer tilbage med baseparsubstitutionsmutagener, der inducerer punktmutationer eller ochre suppressormutationer. XV 185-14C er også bærer af his 1-7 markøren, som er en missense-mutation, der hovedsagelig muterer tilbage ved mutationer i andre loci, og markøren hom 3-10, der muterer tilbage med frameshift-mutagener.

Den eneste bredt anvendte diploide stamme af S. cerevisiae er D_7, der er homozygot i ilv 1-92.

1.5. **Kvalitetskriterier**

Ingen.

1.6. **Beskrivelse af testmetoden**

Forberedelser

Opløsninger af teststof og kontrol fremstilles umiddelbart inden testen under anvendelse af et passende vehikel. Hvis der anvendes organiske kemiske forbindelser, som er uopløselige i vand, kan organiske opløsningsmidler som ætanol, acetone eller dimetylsulfoxid (DMSO) bruges i koncentrationer på op til 2 % v/v. Koncentrationen af vehiklet bør ikke medføre nogen ændring i cellevitalitet og vækstkarakteristika.

Metabolisk aktivering

Cellerne eksponeres for teststoffet både med og uden tilsætning af et passende eksogent metabolisk aktiveringssystem.

Det hyppigst anvendte system består af en co-faktorberiget postmitochondrisk fraktion af lever fra gnavere, som er forbehandlede med enzyminducerende stoffer. Andre dyrearter, væv, post-mitochondriske fraktioner eller fremgangsmåder kan også være egnede til metabolisk aktivering.

Forsøgsbetingelser

Teststammer

Den haploide stamme XV 185-14C og den diploide stamme D_7 er de hyppigst anvendte i genmutationsundersøgelser. Også andre stammer kan være egnede.

Medier

Ved bestemmelse af overlevelsesgrad og antal mutanter anvendes passende kulturmedier.

Negative og positive kontroller

Sideløbende med testkulturerne dyrkes positive kontrolkulturer, ubehandlede kontrolkulturer og kontrolkulturer med det anvendte opløsningsmiddel. Der anvendes egnede positive kontrolstoffer for hvert enkelt genetisk endpoint.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes mindst fem forskellige koncentrationer af teststoffet med passende intervaller mellem koncentrationerne. Når der testes toksiske stoffer, bør den højeste koncentration ikke reducere overlevelsesgraden til mindre end 5 til 10 %. Stoffer, som er relativt uopløselige i vand, testes under anvendelse af passende fremgangsmåder op til opløselighedsgrænsen. Den højeste koncentration af ikke-toksiske teststoffer, som er frit opløselige i vand, fastlægges fra stof til stof.

Inkubationsbetingelser

Pladerne inkuberes i fire til syv dage mellem 28 og 30° C i mørke.

Spontane mutationsfrekvenser

Der anvendes subkulturer med spontane mutationsfrekvenser, som ligger inden for de almindeligt accepterede områder.

Antal parallelle plader

Der anvendes mindst tre parallelle plader for hver koncentration ved bestemmelsen af prototrofer, som er fremkommet ved genmutation, og af cellernes levedygtighed. Når man tester markører, der som hom 3-10 har en lav mutationsfrekvens, må antallet af plader forøges, således at der kan tilvejebringes en statistisk relevant mængde data.

Fremgangsmåde

Stammer af S.cerevisiae eksponeres normalt ved test i væske, hvortil der anvendes enten celler i stationærfase eller celler i vækstfase. Indledende undersøgelser bør udføres med celler i vækstfase. $1—5 \times 10^7$ celler pr. ml eksponeres for teststoffet i op til 18 timer ved 28 til 37° C under omrystning. Hvis det er nødvendigt, tilsættes en passende mængde metabolisk aktiveringssystem under eksponeringen. Efter eksponeringen centrifugeres og vaskes cellerne, hvorefter de udsås på et egnet kulturmedium. Når inkubationen er slut, registreres induktionen af genmutationer og antal overlevende på hver plade. Hvis den første undersøgelse er negativ, bør en anden udføres under anvendelse af celler i stationærfase. Hvis den første undersøgelse er positiv, skal det efterprøves i et passende uafhængigt forsøg.

2. DATA

Data opstilles i tabelform. Antal optalte kolonier, antal mutanter, overlevelsesfrekvens samt mutationsfrekvens angives. Alle resultater efterprøves i et uafhængigt forsøg. Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— den anvendte stamme

— forsøgsbetingelser: celler i stationær fase eller vækstfase, mediernes sammensætning, inkubationstemperatur og -periode, metabolisk aktiveringssystem

— eksponeringsbetingelser: eksponeringskoncentrationer, fremgangsmåde og varighed, eksponeringstemperatur, positive og negative kontroller

— antal optalte kolonier, antal mutanter, overlevelses- og mutationsfrekvens, om muligt dosis-responsforhold, statistisk evaluering af data

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Evaluering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. REFERENCER

Se den generelle indledning til afsnit B.

B. 16

MITOTISK REKOMBINATION — SACCHAROMYCES CEREVISIAE

1. **METODE**

1.1. **Indledning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. **Definitioner**

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. **Referencestoffer**

Ingen.

1.4. **Princip for testmetoden**

Der kan hos Saccharomyces cerevisiae konstateres mitotisk rekombination mellem gener (eller mere generelt mellem et gen og dets centromer) og inden for det samme gen. Den førstnævnte form kaldes mitotisk overkrydsning og frembringer reciprokke typer, mens den sidstnævnte som oftest ikke er reciprok og kaldes genbytning. Overkrydsning bestemmes almindeligvis ved frembringelse af recessive homozygote kolonier eller sektorer i en heterozygot stamme, mens genbytning bestemmes ved frembringelse af prototrofe revertanter i en auxotrof heteroallel stamme, som bærer to forskellige, defekte alleler af det samme gen. De hyppigst anvendte stammer ved undersøgelse af mitotisk genbytning er D_4 (med heteroallele ade 2 og trp 5), BZ_{34} (med heteroallel arg 4), D_7 (med heteroallel trp 5) og JD_1 (med heteroallele his 4 og trp 5). Mitotisk overkrydsning, som frembringer røde og lyserøde sektorer, kan undersøges i D_5 og D_7 (der også kan bruges til bestemmelse af mitotisk genbytning og tilbagemutation af ilv 1-92), idet begge stammer bærer heteroallele komplementære alleler til ade 2.

1.5. **Kvalitetskriterier**

Ingen.

1.6. **Beskrivelse af testmetoden**

Forberedelser

Opløsninger af teststof og kontrol- eller referencestoffer fremstilles umiddelbart inden testen under anvendelse af et passende opløsningsmiddel. Hvis der anvendes organiske kemiske forbindelser, som er uopløselige i vand, kan organiske opløsningsmidler som ætanol, acetone eller dimetylsulfoxid (DMSO) bruges i koncentrationer på op til 2 % v/v. Koncentrationen af vehiklet bør ikke medføre nogen ændring i cellevitalitet og vækstkarakteristika.

Metabolisk aktivering

Cellerne eksponeres for teststof både med og uden tilsætning af et passende eksogent metabolisk aktiveringssystem.

Det hyppigst anvendte system består af en co-faktorberiget postmitochondrisk fraktion af lever fra gnavere, som er forbehandlede med enzyminducerende stoffer. Andre dyrearter, væv, postmitochondriske fraktioner eller fremgangsmåder kan også være egnede til metabolisk aktivering.

Forsøgsbetingelser

Teststammer

De hyppigst anvendte stammer er de diploide D_4, D_5, D_7 og JD_1. Også andre stammer kan være egnede.

Medier

Ved bestemmelse af overlevelsesgrad og mitotisk rekombinationsfrekvens anvendes passende kulturmedier.

Negative og positive kontroller

Sideløbende med testkulturerne dyrkes positive kontrolkulturer, ubehandlede kontrolkulturer og kontrolkulturer med det anvendte opløsningsmiddel. Der anvendes egnede positive kontrolstoffer for hvert enkelt genetisk endpoint.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes mindst fem forskellige koncentrationer af teststoffet med passende intervaller mellem koncentrationerne. Herunder må man tage hensyn til faktorer som cytotoksicitet og opløselighed. De laveste koncentrationer bør ikke have nogen indvirkning på cellernes levedygtighed. Når der testes toksiske stoffer, bør den højeste koncentration ikke reducere overlevelsesgraden til mindre end 5 til 10 %. Stoffer, som er relativt uopløselige i vand, testes under anvendelse af passende fremgangsmåder op til opløselighedsgrænsen. Den højeste koncentration af ikke-toksiske teststoffer, som er frit opløselige i vand, fastlægges fra test til test.

Celler i stationær fase eller vækstfase kan eksponeres for teststoffet i op til 18 timer. Benyttes der lange eksponeringsperioder, bør kulturerne dog undersøges mikroskopisk for sporedannelse, idet disses tilstedeværelse gør testen værdiløs.

Inkubationsbetingelser

Pladerne inkuberes i fire til syv dage mellem 28 og 30° C i mørke. Plader, som anvendes til bestemmelse af røde og lyserøde homozygote sektorer, der er frembragt ved mitotisk overkrydsning, opbevares i køleskab (omkring 4° C) i yderligere en til to dage inden optælling for at muliggøre udvikling af de rette pigmenterede kolonier.

Spontane mitotiske rekombinationsfrekvenser

Der anvendes subkulturer med spontane mitotiske frekvenser, som ligger inden for de almindeligt accepterede områder.

Antal parallelle plader

Der anvendes mindst tre parallelle plader for hver koncentration ved bestemmelsen af prototrofer, som er fremkommet ved mitotisk genbytning, og af cellernes levedygtighed. Når man tester recessive homozygoter, som er frembragt ved mitotisk overkrydsning, forøges antallet af plader, således at der opnås et passende antal kolonier.

Fremgangsmåde

Stammer af S.cerevisiae eksponeres normalt ved test i væske, hvortil der anvendes enten celler i stationær fase eller celler i vækstfase. Indledende undersøgelser bør udføres med celler i vækstfase. 1—5 $\times$ 10^7 celler pr. ml eksponeres for teststoffet i op til 18 timer ved 28 til 37° C under omrystning. Under eksponeringen tilsættes en passende mængde metabolisk aktiveringssystem. Efter eksponeringen centrifugeres og vaskes cellerne, hvorefter de udsås på et egnet kulturmedium. Når inkubationen er slut, registreres induktionen af mitotisk rekombination og antal overlevende på hver plade. Hvis den første undersøgelse er negativ, bør en anden udføres under anvendelse af celler i stationær fase. Hvis den første undersøgelse er positiv, skal det efterprøves i et passende uafhængigt forsøg.

2. DATA

Data opstilles i tabelform. Antal optalte kolonier, antal rekombinanter, overlevelsesgrad samt rekombinationsfrekvens angives. Alle resultater efterprøves i et uafhængigt forsøg. Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— den anvendte stamme

— forsøgsbetingelser: celler i stationær fase eller vækstfase, mediernes sammensætning, inkubationstemperatur og -periode, metabolisk aktiveringssystem

— eksponeringsbetingelser: eksponeringskoncentrationer, fremgangsmåde og varighed, eksponeringstemperatur, positive og negative kontroller

— antal optalte kolonier, antal rekombinanter, overlevelses- og rekombinationsfrekvens, om muligt dosis-responsforhold, statistisk evaluering af data

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Evaluering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. REFERENCER

Se den generelle indledning til afsnit B.

B.17 MUTAGENICITET - IN VITRO-TEST FOR GENMUTATION I PATTEDYRCELLER

1. METODE

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 476 "*In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test" (1997).

1.1 INDLEDNING

In vitro-testen for genmutation i pattedyrceller kan benyttes til at påvise genmutationer, som induceres af kemiske stoffer. Blandt egnede cellelinjer er muselymfomceller L5178Y, cellelinjerne CHO, CHO-AS52 og V79 fra kinesisk hamster og humane lymfoblastceller TK6 (1). I disse cellelinjer benyttes som genetiske endpoints almindeligvis bestemmelse af mutationer ved thymidin-kinase (TK), hypoxantin-guanin-fosforibosyl-transferase (HPRT) og et transgen af xanthin-guanin-fosforibosyl-transferase (XPRT). I TK-, HPRT- og XPRT-mutationstestene påvises forskellige spektre af genetiske hændelser. Med TK og XPRT kan der på grund af deres autosomale placering påvises genetiske hændelser (f.x. større deletioner), der ikke kan påvises ved HPRT-locus'et på X-kromosomer (2)(3)(4)(5)(6).

I in vitro-testen for genmutation i pattedyrceller kan der benyttes kulturer af etablerede cellelinjer eller cellestammer. Cellerne udvælges på grundlag af deres vækstegenskaber ved dyrkning og den spontane mutationsfrekvens's stabilitet.

Normalt kræver en in vitro-test, at der benyttes en exogen metabolismeaktivering. Et sådant metabolismeaktiveringssystem kan ikke fuldstændigt efterligne forholdene i pattedyr in vivo. Man må omhyggeligt undgå forhold, der fører til resultater, der ikke afspejler egentlig mutagenicitet. Positive resultater, der ikke afspejler egentlig mutagenicitet, kan være forårsaget af ændringer i pH eller osmolalitet eller høj cytotoksicitet (7).

Testen benyttes til screening for stoffer, der kan være mutagene eller carcinogene hos pattedyr. Mange af de stoffer, der er positive ved denne test, er carcinogene hos pattedyr, men korrelationen mellem denne test og carcinogenicitet er ikke fuldstændig. Den afhænger af den kemiske klasse, og stadig mere tyder på, at der findes carcinogener, der ikke påvises ved denne test, fordi de tilsyneladende virker gennem andre ikke-gentoksiske mekanismer eller mekanismer, der ikke findes i bakterieceller (6).

Se også den generelle indledning til afsnit B.

1.2 DEFINITIONER

Fremadmutation: En genmutation fra forældretypen til mutanten, som medfører ændring i eller tab af det kodede proteins enzymaktivitet.

Basesubstitutionsmutagen: Et stof, der fremkalder substitution af et eller flere DNA-basepar.

Læserammemutagen: Et stof, der fremkalder addition eller deletion af et eller flere basepar i DNA-molekylet.

Fænotypeekspressionsperiode: Et tidsrum, hvorunder uændrede genprodukter gradvis forsvinder fra nylig muterede celler.

Mutanthyppighed: Antallet af observerede mutantceller divideret med antallet af levedygtige celler.

Relativ total vækst: Forøgelsen af celleantallet i et tidsrum, sammenlignet med en kontrolpopulation af celler; beregnes som produktet af suspensionsvæksten i forhold til den negative kontrol og klondannelseseffektiviteten i forhold til den negative kontrol

Relativ suspensionsvækst: Forøgelsen af celleantallet i ekspressionsperioden i forhold til den negative kontrol.

Levedygtighed: De behandlede cellers klondannelseseffektivitet på tidspunktet for selektiv udpladning efter ekspressionsperioden.

Overlevelse: De behandlede cellers klondannelseseffektivitet ved udpladningen efter behandlingsperioden; overlevelsen udtrykkes normalt i forhold til overlevelsen i kontrolcellepopulationen.

1.3 TESTMETODENS PRINCIP

Celler, som mangler thymidin-kinase (TK) på grund af fremadmutationen $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$, er resistente over for de cytotoksiske virkninger af pyridinanalogen trifluorthymidin (TFT). Celler, som har thymidin-kinase, er følsomme over for TFT, som inhiberer cellemetabolismen og standser den videre celledeling. Det betyder, at mutantceller kan formere sig under tilstedeværelse af TFT, mens normale celler, der indeholder thymidin-kinase, ikke kan. På tilsvarende måde kan celler, der mangler HPRT eller XPRT, udvælges ved deres modstandsdygtighed over for henholdsvis 6-thioguanin (TG) og 8-azaguanin (AG). Hvis der i en af genmutationstestene med pattedyrceller testes et stof, der er baseanalogt med det selektive stof eller beslægtet hermed, må der først ses nøje på teststoffets egenskaber. Eksempelvis bør enhver mistanke om, at teststoffet har selektiv toksicitet over for mutantceller og ikke-mutantceller, undersøges. Det vil sige, at det selektive system/stofs egnethed skal bekræftes, når der testes stoffer, der kemisk er beslægtet med det selektive stof (8).

Celler i suspensionskultur eller enkeltlagskultur udsættes for teststoffet både med og uden metabolismeaktivering i et passende tidsrum, hvorefter der ved dyrkning i subkultur påvises cytotoksicitet og gives mulighed for fænotypeekspression, inden mutanterne udvælges (9)(10)(11)(12)(13). Cytotoksiciteten bestemmes sædvanligvis ved at måle kulturernes relative klondannelseseffektivitet (overlevelse) eller deres relative totale vækst efter behandlingsperioden. De behandlede kulturer holdes så lang tid i vækstmediet, afhængigt af hvert valgt locus og celletype, at fænotypeekspressionen af inducerede mutationer bliver næsten optimal. Mutanthyppigheden bestemmes ved udsåning af et kendt antal celler i et medium, der indeholder det selektive stof, til påvisning af mutantceller og i et medium uden selektivt stof til bestemmelse af klondannelseseffektiviteten (levedygtigheden). Efter en passende inkuberingstid tælles kolonierne. Mutant-hyppigheden afledes af antallet af mutantkolonier i det selektive medium og antallet af kolonier i det ikke-selektive medium.

1.4 BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1 **Præparater**

1.4.1.1 *Celler*

En lang række cellelinjer lader sig anvende i denne test, herunder subkloner af L5178Y, CHO, CHO-AS52, V-79 og TK6-celler. For de celletyper, der benyttes i denne test, bør der være påvist følsomhed over for kemiske mutagener, høj klondannelseseffektivitet og stabil spontan mutationshyppighed. Cellerne bør kontrolleres for forurening med mycoplasma og bør ikke anvendes, hvis de er forurenet.

Testen bør tilrettelægges med forud fastlagt følsomhed og styrke. Antallet af celler, kulturer og koncentrationer af teststof bør afspejle disse valgte parametre (14). Det mindste antal levedygtige celler, der overlever behandling og benyttes i testens faser, baseres på den spontane mutationshyppighed. Som rettesnor kan der anvendes et celleantal, der er mindst 10 gange den reciprokke spontane mutationshyppighed. Det anbefales dog, at der mindst anvendes 10^6 celler. Der skal foreligge tilstrækkelige historiske data om cellesystemet til at dokumentere, at testen har konstant høj effektivitet.

1.4.1.2 *Medier og dyrkningsbetingelser*

Der benyttes egnede dyrkningsmedier og inkuberingsbetingelser (dyrkningsbeholdere, temperatur, CO_2-koncentration, luftfugtighed). Medier vælges efter, hvilke selektive systemer og celletyper der benyttes i testen. Det er især vigtigt at vælge sådanne dyrkningsbetingelser, at både mutantcellers og ikke-mutantcellers vækst og kolonidannelse bliver optimal under ekspressionsperioden.

1.4.1.3 *Fremstilling af kulturer*

Cellerne opformeres fra stamkulturer, udsås i dyrkningsmedium og inkuberes ved 37°C. Det kan være nødvendigt at rense kulturerne for allerede-eksisterende mutanter, inden de benyttes i denne test.

1.4.1.4 *Metabolismeaktivering*

Cellerne udsættes for teststoffet både med og uden et egnet metabolismeaktiveringssystem. Det mest almindeligt anvendte system er en cofaktorsuppleret postmitokondriefraktion (S9), der fremstilles af levere fra rotter, der har været behandlet med enzyminducerende stoffer såsom Aroclor 1254 (15)(16)(17)(18) eller en blanding af phenobarbiton og β-naphthoflavon (19)(20).

Postmitokondriefraktionen anvendes normalt i en koncentration på 1-10 % (v/v) i det færdige testsubstrat. Valget af metabolismeaktiveringssystem og dets beskaffenhed kan afhænge af, hvilken kemisk klasse teststoffet tilhører. I nogle tilfælde vil det være hensigtsmæssigt at benytte postmitokondriefraktion i mere end én koncentration.

Nogle udviklingstendenser, f.eks. genetisk konstruktion af cellelinjer, der udtrykker specifikke aktiverende enzymer, kan rumme potentiale for endogen aktivering. Valget af en bestemt cellelinje skal begrundes sagligt (f.eks. ved, at cytochrom P450-coenzymet er relevant for teststoffets metabolisme).

1.4.1.5 *Teststof/testpræparat*

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærere og fortyndes passende inden behandling af cellerne. Teststoffer i væskeform kan enten tilsættes direkte til testsystemet eller fortyndes inden behandlingen. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

1.4.2 **Testbetingelser**

1.4.2.1 *Opløsningsmiddel/bærer*

Der må ikke være mistanke om, at opløsningsmiddel/bærer reagerer kemisk med teststoffet, og opløsningsmiddel/bærer må hverken hæmme cellernes overlevelse eller S9-aktiviteten. Benyttes der andre opløsningsmidler/bærere end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærersystem. Ved undersøgelse af stoffer, der er ustabile i vand, skal de organiske opløsningsmidler være vandfrie. Vand kan fjernes ved tilsætning af molekylsi.

1.4.2.2 *Eksponeringskoncentrationer*

Stoffets cytotoksicitet, dets opløselighed i testsystemet samt ændringer i pH og osmolalitet er blandt de kriterier, der skal tages hensyn til ved valg af højeste koncentration.

Cytotoksiciteten bestemmes med og uden metabolismeaktivering i hovedforsøget ved hjælp af en passende indikator for celleintegritet og -vækst, f.eks. relativ klondannelseseffektivitet (overlevelse) eller relativ total vækst. Det kan være hensigtsmæssigt at bestemme cytotoksicitet og opløselighed ved et indledende forsøg.

Der benyttes mindst 4 analyserbare koncentrationer. Hvis der er tale om cytotoksicitet, skal koncentrationerne dække et interval fra største toksicitet til ringe eller ingen toksicitet; det betyder normalt, at koncentrationerne højst er adskilt med en faktor mellem 2 og $\sqrt{10}$. Hvis den højeste koncentration er baseret på cytotoksicitet, bør den føre til en relativ overlevelse (relativ klondannelseseffektivitet) eller relativ total vækst på ca. 10-20% (ikke under 10%). For stoffer, der er forholdsvis ikke-cytotoksiske, må testkoncentrationen højst være 5 µl/ml, 5 mg/ml eller 0,01 M (den laveste af de tre).

Forholdsvis uopløselige stoffer testes op til eller over opløselighedsgrænsen ved dyrkningsbetingelserne. Tegn på uopløselighed bør konstateres i det endelige behandlingsmedium, som cellerne udsættes for. Det kan være hensigtsmæssigt at bedømme opløseligheden både ved behandlingens begyndelse og afslutning, eftersom opløseligheden kan ændre sig under eksponeringen i testsystemet som følge af, at der er celler, S9, serum m.v. til stede. Uopløselighed kan iagttages med det blotte øje. Bundfald må ikke have indflydelse på bedømmelsen.

1.4.2.3 *Kontrolprøver*

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærer) kontrolprøver, såvel med som uden metabolismeaktivering. Når der benyttes metabolismeaktivering, bør der som positivt kontrolkemikalie anvendes et, der kræver aktivering for at virke mutagent.

Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolstoffer.

Metabolisme-aktivering	**Locus**	**Stof**	**CAS nr.**	**EINECS nr.**
Ingen exogen metabolisme-aktivering	HPRT	Ethylmethansulfonat	62-50-0	200-536-7
		Ethylnitrosourea	759-73-9	212-072-2
	TK (små og store kolonier)	Methylmethansulfonat	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Ethylmethansulfonat	62-50-0	200-536-7
		Ethylnitrosourea	759-73-9	212-072-2
Exogen metabolisme-aktivering	HPRT	3-methylcholanthren	56-49-5	200-276-4
		N-nitrosodimethylamin	62-75-9	200-549-8
		7,12-dimethylbenzanthracen	57-97-6	200-359-5
	TK (små og store kolonier)	Cyclophosphamid	50-18-0	200-015-4
		Cyclophosphamid monohydrat	6055-19-2	
		Benzo[*a*]pyren	50-32-8	200-028-5
		3-methylcholanthren	56-49-5	200-276-5
	XPRT	*N*-nitrosodimethylamin (ved højt indhold af S-9)	62-75-9	200-549-8
		Benzo[*a*]pyrene	50-32-8	200-028-5

Der kan benyttes andre egnede stoffer til positiv kontrol, f.eks. kan et laboratorium, der har en historisk database over 5-brom-2'-deoxyuridin [CAS nr. 59-14-3, EINECS nr. 200-415-9], også benytte dette referencestof. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer.

Der skal indgå negative kontrolprøver, hvor behandlingsmediet kun består af opløsningsmiddel eller bærer, og som behandles på samme måde som de øvrige kulturer. Desuden skal der være ubehandlede kontrolprøver, medmindre der foreligger tidligere opnåede kontroldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

1.4.3 **Fremgangsmåde**

1.4.3.1 *Behandling med teststof*

Celler under formering udsættes for teststoffet både med og uden metabolismeaktivering. Eksponeringen skal vare en passende tid (normalt har 3-6 timer den fornødne virkning). Eksponeringen kan strække sig over én eller flere cellecyklusser.

Ved hver undersøgt koncentration benyttes der enten en eller to behandlede kulturer. Benyttes der kun én kultur, øges antallet af koncentrationer, således at der bliver tilstrækkeligt mange kulturer til analyse (dvs. mindst 8 analyserbare koncentrationer). Der bør anvendes to negative kontrolkulturer (opløsningsmiddel).

Gasformige og flygtige stoffer testes ved en egnet metode, f.eks. i forseglede dyrkningsflasker (21)(22).

1.4.3.2 *Måling af overlevelse, levedygtighed og mutanthyppighed*

Efter eksponeringen vaskes cellerne og dyrkes med henblik på at bestemme overlevelsen og give mulighed for ekspression af mutantfænotypen. Måling af cytotoksicitet ved bestemmelse af kulturernes relative klondannelseseffektivitet (overlevelse) eller relative totale vækst påbegyndes normalt efter behandlingsperioden.

Hvert locus har et fast mindste tidsrum, som kræves til nær optimal fænotypeekspression af nyligt inducerede mutanter (HPRT og XPRT kræver mindst 6-8 dage og TK mindst 2 dage). Cellerne dyrkes i medier med og uden selektivt stof med henblik på bestemmelse af henholdsvis antallet af mutanter og klondannelseseffektiviteten. Måling af levedygtigheden (der benyttes til beregning af mutanthyppigheden) påbegyndes efter ekspressionstiden ved udpladning på ikke-selektivt medium.

Hvis teststoffet reagerer positivt i L5178Y $TK^{+/-}$-testen, bestemmes kolonistørrelsen i mindst en af testkulturerne (den højeste positive koncentration) og i de positive og negative kontrolkulturer. Hvis teststoffet reagerer negativt i L5178Y $TK^{+/-}$-testen, bestemmes kolonistørrelsen i de positive og negative kontrolkulturer. Også ved undersøgelser med TK6$TK^{+/-}$ kan kolonistørrelsen bestemmes.

2. DATA

2.1 BEHANDLING AF RESULTATER

Dataene skal omfatte bestemmelse af cytotoksicitet og levedygtighed, kimtælling og mutanthyppighed for de behandlede kulturer og kontrolkulturerne. I tilfælde af positiv reaktion i L5178Y $TK^{+/-}$-testen, bedømmes kolonierne ud fra kriterier om små og store kolonier ved mindst én koncentration af teststoffet (højeste positive koncentration) og med den negative og positive kontrol. Den molekylære og cytogenetiske natur af mutanter i både store og små kolonier er udforsket detaljeret (23)(24). I $TK^{+/-}$-testen bedømmes kolonierne efter kriterier for normalt voksende (store) og langsomt voksende (små) kolonier (25). De mutantceller, der har de mest alvorlige genetiske skader, har længere fordoblingstider og danner derfor mindre kolonier. Sådanne skader ligger typisk fra tab af hele genet til karyotypisk synlige kromosomaberrationer. Induktion af mutanter i små kolonier har været tilskrevet kemikalier, der fremkalder kromosomaberrationer, der kan ses med det blotte øje (26). Mindre alvorligt berørte mutantceller vokser med omtrent samme hastighed som modercellerne og danner store kolonier.

Overlevelsen (den relative klondannelseseffektivitet) eller den relative totale vækst skal oplyses. Mutanthyppigheden opgives som antallet af mutantceller i forhold til antallet af overlevende celler.

Der anføres data for hver enkelt kultur. Derudover sammenfattes alle data i tabelform.

Der findes ingen krav til verifikation af et klart positivt resultat. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere undersøgelser, helst med ændrede forsøgsbetingelser. Negative resultater bekræftes efter en vurdering af de enkelte tilfælde. Anses bekræftelse af negative resultater ikke for nødvendigt, skal dette begrundes. Ved forsøg til opfølgning af tvetydige eller negative resultater bør man overveje at ændre på undersøgelsens parametre, så de bedømte forsøgsbetingelser udvides. Blandt de undersøgelsesparametre, der kan ændres på, er koncentrationernes spredning og metabolismeaktiveringen.

2.2 EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Der findes en række kriterier for, om der er opnået et positivt resultat, f.eks. en koncentrationsafhængig eller reproducerbar forøgelse af mutanthyppigheden. Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne. Statistisk signifikans bør ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt.

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagent i denne test.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en in vitro-test for genmutation i pattedyrceller viser, at teststoffet fremkalder genmutationer i de benyttede dyrkede pattedyrceller. En positiv koncentrationsafhængig reproducerbar respons er mest sigende. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke fremkalder genmutationer i de benyttede dyrkede pattedyrceller.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærer:

- begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærer
- teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærer, hvis den kendes

Celler:

- celletype og -kilde
- antal cellekulturer
- eventuelt antal passager
- eventuelle metoder til vedligehold af cellekultur
- fravær af mycoplasma

Testbetingelser:

- begrundelse for valg af koncentrationer og antal kulturer, herunder f.eks. eventuelle cytotoksicitetsdata og opløselighedsbegrænsninger
- substratsammensætning og eventuel CO_2-koncentration
- teststoffets koncentration
- volumen af tilsat bærer og teststof
- inkuberingstemperatur
- inkuberingstid
- behandlingens varighed
- celletæthed under behandlingen
- stoffer
- metabolismeaktiveringssystemets type og sammensætning, herunder acceptkriterier
- positive og negative kontrolprøver
- ekspressionsperiodens længde (herunder antal udsåede celler, subkulturer og eventuel feeding)
- selektive kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig
- metoder til tælling af levedygtige celler og mutantceller
- definition af kolonier, hvor størrelse og type lægges til grund (herunder kriterier for, hvilke kolonier der er "små" og "store")

Resultater:

- tegn på toksicitet
- tegn på udfældning
- data om pH og osmolalitet under udsættelsen for teststoffet, hvis disse værdier er målt
- kolonistørrelse, hvis den er bedømt, i hvert fald for negative og positive kontrolkulturer
- laboratoriets kapacitet til at påvise mutanter i små kolonier med L5178Y $TK^{+/-}$-systemet
- dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt
- eventuelle statistiske analyser
- data for sideløbende negative (opløsningsmiddel/bærer) og positive kontrolprøver
- data for tidligere negative (opløsningsmiddel/bærer) og positive kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser
- mutanthyppighed

Diskussion af resultaterne.

Konklusioner.

4. REFERENCER

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

2. Chu, E.H.Y. and Malling, H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306-1312.

3. Liber, H.L. and Thilly, W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts. Mutation Res., 94, 467-485.

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

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

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

7. Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-204.

8. Clive, D., McCuen, R., Spector, J.F.S., Piper, C. and Mavournin, K.H. (1983). Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 115, 225-251.

9. Li, A.P., Gupta, R.S., Heflich, R.H. and Wasson, J.S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 196, 17-36.

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

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

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

13. Turner, N.T., Batson, A.G. and Clive, D. (1984). Procedures for the L5178Y/$TK^{+/-}$ - $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay. In: Kilbey, B.J. et al (eds.) Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.

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

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

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

17. 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. Mutat. Res., 59, 61-108.

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

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

20. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

21. Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91-103.

22. 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. Environmental Mutagenesis, 5, 795-801.

23. 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. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 51-55.

24. 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 (TFT^{r}) Mutants of L5178Y/TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151, 161-174.

25. Yandell, D.W., Dryja, T.P. and Little, J.B. (1990). Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells. Mutation Res., 229, 89-102.

26. Moore, M.M. and Doerr, C.L. (1990). Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK$^{+/-}$ -3.7.2C Mouse Lymphoma Cells. Mutagenesis, 5, 609-614.

B. 18

DNA-SKADE OG DNA-REPARATION — UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS — PATTEDYRCELLER IN VITRO

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Ved Unscheduled DNA Synthesis (UDS) test undersøges DNA-reparationen efter bortskæring og fjernelse af skader, som er induceret af kemiske eller fysiske agentia. Testen bygger på inkorporering af tritiummærket thymidin (^{3}H-TdR) i pattedyrcellers DNA, når disse celler ikke er i S-fase. Optagelsen af ^{3}H-TdR kan måles ved autoradiografi eller væskescintillationstælling (LSC) af DNA fra de eksponerede celler. Medmindre der anvendes primærkulturer af rottehepatocytter, eksponeres dyrkede pattedyrceller for teststoffet med og uden et eksogen metabolisk aktiveringssystem. UDS-test kan også foretages i in vivo-systemer.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Teststof samt kontrol- og referencestoffer tilsættes kulturmediet eller opløses eller suspenderes i egnede vehikler og tilsættes derefter kulturmediet inden testen. Den derved opnåede vehikelkoncentration bør ikke påvirke cellernes levedygtighed. Der kan anvendes primærkulturer af rottehepatocytter, humane lymfocytter eller etablerede cellelinjer (f.eks. humane diploide fibroblaster).

Cellerne eksponeres for teststoffet med og uden et passende metabolisk aktiveringssystem.

Forsøgsbetingelser

Antal kulturer

Ved autoradiografisk påvisning af UDS anvendes mindst to og ved LSC seks kulturer (eller mindre hvis det er videnskabeligt begrundet) for hvert eksperimentelt punkt.

Negative og positive kontroller

Der foretages sideløbende både positiv og negativ (ubehandlet og/eller vehikel) kontrol med og uden metabolisk aktivering i hvert forsøg.

Som positiv kontrol ved anvendelse af rottehepatocytter kan f.eks. benyttes 7,12-DMBA (7,12-dimetylbenzanthracen) eller 2-AAF (2-acetylaminofluoren). Som positiv kontrol ved anvendelse af etablerede cellelinjer kan f.eks. benyttes 4-NQO (4-nitroquinolin-N-oxid) både i forbindelse med autoradiografisk registrering og LSC uden metabolisk aktivering. Når der anvendes metaboliske aktiveringssystemer kan f.eks. N-dimetylnitrosamin benyttes til positiv kontrol.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes en række forskellige koncentrationer af teststoffet over et interval, som dækker alle påvirkninger. Den højeste koncentration bør have en vis cytotoksisk virkning. Stoffer, som er relativt uopløselige i vand, testes op til opløselighedsgrænsen.

Den højeste koncentration af ikke-toksiske teststoffer, som er frit opløselige i vand, fastlægges fra test til test.

Celler

Der benyttes passende vækstmedier, CO_2-koncentration, temperatur og fugtighed til opretholdelse af kulturerne. Det undersøges regelmæssigt om etablerede cellelinjer er kontamineret med mycoplasma.

Metabolisk aktivering

Der anvendes ikke metaboliske aktiveringssystemer i forbindelse med primærkulturer af hepatocytter.

Etablerede cellelinjer og lymfocytter eksponeres for teststoffer både med og uden et passende metabolisk aktiveringssystem.

Fremgangsmåde

Forberedelse af kulturer

Etablerede cellelinjer fremstilles på basis af stamkulturer (f.eks. ved trypsinering eller afrystning) og udsås med passende tæthed i dyrkningsskåle, hvorefter de inkuberes ved 37° C.

Primære rottehepatocytkulturer etableres, når hepatocytter umiddelbart efter isolering anbringes i et passende medium og får lov til at hæfte sig til den voksende overflade.

Humane lymfocytkulturer dyrkes under anvendelse af dertil egnede teknikker.

Eksponering af kulturerne for teststoffet

Primærkulturer af rottehepatocytter

Rottehepatocytter eksponeres for teststoffet kort tid efter isolering i et passende tidsrum i et medium, som indeholder ^{3}H-TdR. Efter eksponeringen fjernes cellerne fra mediet, hvorefter de vaskes, fikseres og tørres.

Pladerne dyppes i en autoradiografisk emulsion (alternativt kan »stripping« film anvendes) og eksponeres, fremkaldes, farves og tælles.

Etablerede cellelinjer og lymfocytter

Autoradiografisk teknik: Cellekulturerne eksponeres først for teststoffet i et passende tidsrum og derefter for ^{3}H-TdR. Eksponeringsperioderne afhænger af stofferne, de metaboliske aktiveringssystemer og celletyperne. Eksponeringen for ^{3}H-TdR bør enten foregå samtidig med eksponeringen for teststoffet eller få minutter efter, således at UDS måles på det tidspunkt, hvor aktiviteten er størst.

Valget mellem de to fremgangsmåder afhænger af risikoen for interaktion mellem teststoffet og ^{3}H-TdR.

Det er muligt at skelne mellem UDS og semi-konservativ DNA replication, idet den sidstnævnte proces inhiberes ved anvendelse af f.eks. argininfattige medier, et lavt serumindhold eller tilsætning af hydroxyurinstof til kulturmediet.

LSC-måling af UDS: Inden eksponering for teststoffet blokeres cellernes overgang til S-fasen som tidligere beskrevet. Derefter eksponeres cellerne på samme måde som ved den autoradiografiske teknik. Umiddelbart efter inkubationen ekstraheres cellernes DNA og det totale DNA-indhold samt mængden af inkorporeret ^{3}H-TdR måles.

Når de nævnte teknikker anvendes på humane lymfocytter, er det unødvendigt at hæmme den semi-konservative DNA replication, med mindre der er tale om stimulerede kulturer.

Analyse

Autoradiografisk måling

Ved måling af UDS i dyrkede celler medregnes kerner i S-fasen ikke. Der tælles mindst 50 celler pr. koncentration. Objektglassene kodes før tællingen. På hvert glas tælles en række forskellige tilfældigt valgte områder med stor indbyrdes afstand. Mængden af inkorporeret ^{3}H-TdR i cytoplasmaet bestemmes ved tælling i tre områder på størrelse med kernen i hver optalt celles cytoplasma.

LSC-måling

Ved LSC-måling af UDS anvendes et passende antal kulturer pr. koncentration og pr. kontrolforsøg. Alle resultater efterprøves i et uafhængigt forsøg.

2. DATA

Data opstilles i tabelform.

2.1. Autoradiografisk måling

Mængden af inkorporeret ^{3}H-TdR i cytoplasmaet og antallet af korn, som registreres i cellekerneområdet, anføres separat. Fordelingen af mængden af inkorporeret ^{3}H-TdR i cytoplasmaet og antallet af korn pr. kerne kan beskrives ved hjælp af middel, median og modus.

2.2. LSC-måling

Ved LSC-måling angives ^{3}H-TdR indlejringen som dpm/µg DNA. Indlejringsfordelingen kan beskrives ved hjælp af middel dpm/µg DNA med tilhørende standardafgivelse. Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— de anvendte celler, tæthed og antal passager på eksponeringstidspunktet, antal cellekulturer

— metoder til opretholdelse af cellekulturer, herunder medium, temperatur og CO_2-koncentration

— teststof, vehikel, koncentrationer og begrundelse for valget af de anvendte koncentrationer

— detaljerede oplysninger om de metaboliske aktiveringssystemer

— eksponeringsplan

— positiv og negativ kontrol

— den anvendte autoradiografiske teknik
— fremgangsmåde ved blokering af cellernes overgang til S-fasen
— fremgangsmåde ved ekstration af DNA og bestemmelse af det totale DNA-indhold ved LSC-målingen
— om muligt dosis-responsforhold
— statistisk evaluering
— diskussion af resultaterne
— fortolkning af resultaterne.

3.2. **Evaluering og fortolkning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. **REFERENCER**

Se den generelle indledning til afsnit B.

B. 19

SØSTERKROMATID OMBYTNING (SCE) IN VITRO

1. **METODE**

1.1. **Indledning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. **Definitioner**

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. **Referencestoffer**

Ingen.

1.4. **Princip for testmetoden**

Søsterkromatid ombytning (SCE) test er en korttidstest, som anvendes til påvisning af reciprok udveksling af DNA mellem de to søsterkromatider i et kromosom under replikation. Ved SCE sker der en udveksling af DNA replikationsprodukter ved tilsyneladende homologe loci. Udvekslingsprocessen bygger antageligt på brud og genforening af DNA-kæder, men dens molekylære grundlag er næsten ukendt. For at kunne påvise SCE er det nødvendigt at differentialmærke søsterkromatiderne, hvilket kan gøres ved at inkorporere bromdeoxyuridin (BrdU) i kromosomernes DNA gennem to cellecykler.

Pattedyrceller eksponeres in vitro for teststoffet med og uden et eksogent metabolisk aktiveringssystem fra pattedyr, hvis dette skønnes relevant, og dyrkes gennem to cellecykler i et medium, som indholder BrdU. Cellerne behandles med en tentrådsinhibitor (f.eks. colchicin) med henblik på at akkumulere celler på et metafaselignende trin i mitosen (c-metafase), hvorefter de høstes og præpareres til kromosomanalyse.

1.5. **Kvalitetskriterier**

Ingen.

1.6. **Beskrivelse af testmetoden**

Forberedelser

— Der kan anvendes primærkulturer (humane lymfocytter) eller etablerede cellelinjer (f.eks. Chinese Hamster Ovary celler). Ved anvendelse af cellelinjer bør det undersøges, om kulturen er kontamineret med mycoplasma.

— Der anvendes egnede kulturmedier og inkubationsbetingelser (temperatur, dyrkningsskåle, CO_2-koncentration og fugtighed).

— Teststoffet tilsættes kulturmediet eller opløses eller suspenderes i et egnet vehikel, inden cellerne eksponeres. Den derved opnåede koncentration af vehikel i testkulturen bør ikke påvirke cellernes levedygtighed eller vækstrate og en mulig påvirkning af SCE-frekvensen kontrolleres ved dyrkning af en kontrolkultur i opløsningsmidlet.

— Cellerne eksponeres for teststoffet både med og uden et eksogent metabolisk aktiveringssystem fra pattedyr. Når der benyttes celletyper med endogen metabolisk aktivering, bør aktiveringsform og -hastighed være egnet til den kemiske stofklasse, der testes.

Forsøgsbetingelser

Antal kulturer

Der anvendes mindst to parallelle kulturer for hvert eksperimentelt punkt.

Positiv og negativ kontrol

Som positiv kontrol anvendes i hvert enkelt forsøg både en direkte virkende kemisk forbindelse og en forbindelse, som kræver metabolisk aktivering. Desuden foretages vehikelkontrol.

Følgende kemiske forbindelser kan f.eks. anvendes til positiv kontrol:

— direkte virkende forbindelse: ætylmetansulfonat

— indirekte virkende forbindelse: cyclofosfamid.

Når det skønnes relevant, bør der foretages supplerende positiv kontrol med anvendelse af en kemisk forbindelse af samme kemiske stofklasse som teststoffet.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes mindst tre koncentrationer af teststoffet med passende intervaller mellem koncentrationerne. Den højeste koncentration bør have en tydelig toksisk virkning, men den må ikke forhindre den nødvendige celledeling. Stoffer, som er relativt uopløselige i vand, testes under anvendelse af passende fremgangsmåder op til opløselighedsgrænsen. Den højeste koncentration af ikke-toksiske teststoffer, som er frit opløselige i vand, fastlægges fra test til test.

Fremgangsmåde

Dyrkning

Cellelinjer etableres på basis af stamkulturer (f.eks. ved trypsinering eller afrystning) og udsås med passende tæthed i dyrkningsskåle, hvorefter de inkuberes ved 37° C. Når der er tale om monolagskulturer, justeres antallet af celler pr. kulturskål, således at kulturerne på høsttidspunktet højst dækker 50 % af vækstarealet. Cellerne kan også dyrkes i suspension. Humane lymfocytkulturer dyrkes under anvendelse af dertil egnede teknikker på basis af hepariniseret blod og inkuberes ved 37° C.

Eksponering

Celler i eksponentiel vækstfase eksponeres for teststoffet i et passende tidsrum. Som oftest vil en eller to timer være tilstrækkeligt, men i nogle tilfælde kan eksponeringsperioden udvides til at dække to fulde cellecykler. Celler, hvis endogene metaboliske aktivering er utilstrækkelig, eksponeres både med og uden tilsætning af et passende metabolisk aktiveringssystem. Efter eksponeringen vaskes cellerne frie for teststof og dyrkes gennem to cellecykler i et medium, som indeholder BrdU. Alternativt kan cellerne eksponeres for teststoffet og BrdU samtidigt gennem en periode svarende til to cellecykler. Humane lymfocytter eksponeres, mens de befinder sig i semisynkron tilstand. Cellerne analyseres under deres anden deling efter eksponeringen, hvilket sikrer, at eksponeringsperioden dækker størstedelen af de følsomme faser i cellecyclus. Alle kulturer, som er tilsat BrdU, opbevares og manipuleres i mørke eller svagt lys fra glødelamper frem til cellerne høstes for at minimere fotolysen af DNA, som indeholder BrdU.

Høst af celler

Cellekulturerne behandles med en tentrådsinhibitor (f.eks. colchicin) en til fire timer, før de høstes. Høst og kromosompræparering foregår særskilt for hver enkelt kultur.

Kromosompræparering og farvning

Ved kromosompræpareringen anvendes cytogenetiske standardteknikker. Farvning på objektglas med henblik på at påvise SCE kan foretages på en række forskellige måder (f.eks. fluorescens plus Giemsafarvning).

Analyse

Antallet af celler, som underkastes analyse, baseres på den spontane SCE-frekvens i kontrolforsøg. Normalt undersøges mindst 25 velpræparerede metafaser pr. kultur for SCE. Objektglassene kodes før analysen.

Ved analyse af humane lymfocytter medtages kun metafaser med 46 centromerer. Ved analyse af etablerede cellelinjer medtages kun metafaser med det modale antal centromerer ± 2. Det anføres, hvorvidt ombytning i mærkningen omkring centromeret betragtes som SCE. Resultaterne efterprøves i et uafhængigt forsøg.

2. DATA

Data opstilles i tabelform. Antal SCE pr. metafase og antal SCE pr. kromosom anføres separat for alle eksponerede kulturer og kontrolkulturer. Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— de anvendte celler, metoder til opretholdelse af cellekulturer

— forsøgsbetingelser: mediernes sammensætning, CO_2-koncentration, teststofkoncentration, det anvendte vehikel, inkubationstemperatur, eksponeringsperiode, den anvendte tentrådsinhibitor plus oplysninger om koncentration og behandlingens varighed, det anvendte metaboliske aktiveringssystem, positiv og negativ kontrol

— antal cellekulturer pr. eksperimentelt punkt

— detaljerede oplysninger om objektpræpareringsteknikken

— antal analyserede metafaser (separate oplysninger for hver enkelt kultur)

— gennemsnitligt antal SCE pr. celle og pr. kromosom (data angives separat for hver kultur)

— SCE-registreringskriterier

— begrundelse for valget af doser

— om muligt dosis-responsforhold

— statistisk evaluering

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Evaluering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. REFERENCER

Se den generelle indledning til afsnit B.

B. 20

KØNSBUNDET RECESSIV LETAL TEST — DROSOPHILA MELANOGASTER

1. METODE

1.1. **Indledning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. **Definitioner**

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. **Referencestoffer**

Ingen.

1.4. **Princip for testmetoden**

Ved kønsbundet recessiv letal test (SLRL) under anvendelse af Drosophila melanogaster undersøges forekomsten af både punktmutationer og mindre tabsmutationer hos insektets afkom. Der er tale om en fremadmutationstest, hvorved det er muligt at screene ca. 800 loci på X-kromosomet med henblik på registrering af mutationer. Dette antal udgør ca. 80 % af alle X-kromosomets loci. X-kromosomet udgør omkring en femtedel af den samlede haploide kromosommængde.

Mutationer i Drosophila melanogasters X-kromosom kommer fænotypisk til udtryk hos hanner, som er bærere af det muterede gen. Når mutationen under hemizygote betingelser er letal, konstateres dette som fravær af en af de to typer hanner, der normalt findes i en heterozygot huns afkom. I SLRL-testen udnyttes dette forhold ved hjælp af specielt arrangerede kromosomer med særlige markører.

1.5 **Kvalitetskriterier**

Ingen.

1.6. **Beskrivelse af testmetoden**

Forberedelser

Stammer

Der kan anvendes hanner af veldefinerede vildtypestammer og hunner fra Muller-5-stammen. Hunner fra andre stammer med passende mærkning og multipelt inverterede X-kromosomer kan også anvendes.

Teststof

Teststoffet opløses i vand. Stoffer, som er uopløselige i vand, kan opløses eller suspenderes i egnede bærestoffer (f.eks. en blanding af ætanol og Tween-60 eller -80) og derefter fortyndes i vand eller saltvand inden indgift. Dimetylsulfoxid bør ikke benyttes som bærestof.

Antal

Testen udformes således, at testfølsomhed og -specificitet er fastlagt på forhånd. Den spontane mutationsfrekvens, som registreres i kontrolforsøg, vil være af stor betydning for antallet af eksponerede kromosomer, der skal analyseres.

Administrationsmåde

Eksponeringen kan foregå ved oral indgivelse, injektion eller ved udsættelse for gasser eller dampe. Teststoffet kan eventuelt indgives i en sukkeropløsning. Om nødvendigt kan det opløses i en 0,7 % NaCl-opløsning og injiceres i thorax eller abdomen.

Negative og positive kontroller

Der foretages negativ (vehikel) og positiv kontrol. Hvis der foreligger egnede historiske kontroldata fra laboratorieforsøg, er det imidlertid ikke nødvendigt at foretage sideløbende kontrol.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes tre eksponeringskoncentrationer. Til en foreløbig vurdering kan anvendes en enkelt koncentration, som enten kan være den højeste koncentration, insekterne kan tåle, eller en koncentration, som forårsager nogen grad af toksisk virkning. Ved ikke-toksiske stoffer eksponeres for de størst mulige koncentrationer.

Fremgangsmåde

Vildtypehanner (tre til fem dage gamle) eksponeres for teststoffet og parres enkeltvis med flere jomfruelige hunner fra Muller-5-stammen eller fra andre stammer med passende markører (multipelt inverterede X-kromosomer). Hunnerne udskiftes med nye jomfruelige hunner hver anden eller hver tredje dag, indtil hele kønscellecyklus er dækket. Hunnernes afkom registreres med henblik på konstatering af letale effekter, som svarer til eskponeringens virkning på henholdsvis modne sædceller, spermatider i sene stadier eller middelstadier, spermatider i tidlige stadier, spermatocytter og spermatogonier. Heterozygote F_1-hunner fra de ovennævnte krydsninger parres individuelt (dvs. en hun pr. glas) med deres brødre. I F_2-generationen registreres hver bestand med henblik på konstatering af fravær af vildtypehanner. Hvis en bestand er afkom af en F_1-hun, som synes at bære et letalt gen i det parentale X-kromosom (dvs. der optræder ingen hanner med det eksponerede kromosom), testes døtre af denne hun med samme genotype med henblik på konstatering af, om den letale effekt gentages i næste generation.

2. DATA

Data opstilles i tabelform. Antal testede X-kromosomer, antal ufrugtbare hanner og antal letale kromosomer anføres for hver eksponeringskoncentration og for hver enkelt af de eksponerede hanners parringsperioder. Ligeledes anføres antal klynger af forskellig størrelse pr. han. Alle resultater efterprøves i et uafhængigt forsøg.

Evalueringen af kønsbunden recessiv letal test baseres på passende statistiske metoder. I tilfælde af ophobning af generationer med recessive letale gener, som stammer fra en enkelt han, registreres disse og evalueres på et passende statistisk grundlag.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— stammer: de anvendte Drosophila-stammer, insekternes alder, antal eksponerede hanner, antal sterile hanner, antal etablerede F_2-bestande, antal F_2-bestande uden afkom, antal kromosomer med letale gener på hvert kønscellestadium

— kriterier for fastlæggelse af størrelsen af de eksponerede grupper

— forsøgsbetingelser: detaljeret beskrivelse af eksponerings- og stikprøvetagningsplan, eksponeringskoncentrationer, toksicitetsdata, negativ (opløsningsmiddel) og positiv kontrol, såfremt der foretages kontrol

— kriterier for registrering af letale mutationer

— om muligt dosis-responsforhold

— statistisk evaluering

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Evaluering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. REFERENCER

Se den generelle indledning til afsnit B.

B. 21

CELLETRANSFORMATIONSTEST — PATTEDYRCELLER IN VITRO

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Principper for testmetoden

Kulturer af pattedyrceller kan anvendes til påvisning in vitro af fænotypiske forandringer, som induceres af kemiske forbindelser, der forbindes med maligne transformationer in vivo. Hyppigt anvendte celletyper er C3H10T$^{1}/_{2}$, 3T3, SHE, Fischer-rotte, og testene bygger på forandringer i cellemorfologien, vækstevnen eller forankringsevnen i blød agar. Der findes også mindre hyppigt anvendte systemer, som bruges til undersøgelse af andre fysiologiske eller morfologiske forandringer i celler som følge af eksponering for karcinogene kemiske forbindelser. Der er ikke beskrevet nogen direkte virkningsmekanistisk forbindelse mellem cancer og de genetiske endpoints, der anvendes i disse in vitro tests. Nogle af testsystemerne kan anvendes til påvisning af tumorpromotorer. Den cytotoksiske effekt kan bestemmes ved måling af teststoffets påvirkning af evnen til at danne kolonier (kloningsstyrken) eller af kulturernes vækstrater. Formålet med at måle den cytotoksiske effekt er at konstatere, om eksponeringen for teststoffet er toksikologisk relevant, men kan ikke benyttes til beregning af transformationsfrekvensen i alle tests, eftersom nogle kræver lang inkubationstid og/eller overførsel til nye plader.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Celler

Der kan anvendes en række forskellige cellelinjer eller primærceller afhængigt af, hvilken transformationstest der foretages.

Forsøgslederen må sikre, at de anvendte celler undergår relevante fænotypiske forandringer efter eksponering for kendte karcinogener, og forsøgslederens eget laboratorium må have påvist og dokumenteret den anvendte tests validitet og pålidelighed.

Medium

Der anvendes medier og forsøgsbetingelser i overensstemmelse med den anvendte transformationstest.

Teststof

Teststoffet tilsættes kulturmediet eller opløses eller suspenderes i et egnet vehikel, inden cellerne eksponeres. Den derved opnåede vehikelkoncentration bør ikke påvirke cellernes levedygtighed, vækstrate eller transformationsfrekvens.

Metabolisk aktivering

Cellerne eksponeres for teststoffet både med og uden et eksogent metabolisk aktiveringssystem fra pattedyr. Når der benyttes celler med endogen metabolisk aktivering, bør det være påvist, at aktiveringsformen egner sig til den form for kemisk forbindelse, der testes.

Forsøgsbetingelser

Positive og negative kontroller

Som positiv kontrol anvendes i hvert enkelt forsøg både en direkte virkende kemisk forbindelse og en forbindelse, som kræver metabolisk aktivering. Desuden foretages negativ (vehikel) kontrol.

Følgende kemiske forbindelser kan f.eks. anvendes til positiv kontrol:

- direkte virkende forbindelser:
  - etylmetansulfonat
  - β-propiolacton
- forbindelser som kræver metabolisk aktivering:
  - 2-acetylaminofluoren
  - 4-dimetylaminoazobenzen
  - 7,12-dimetylbenzanthracen.

Når det skønnes relevant, bør der foretages supplerende positiv kontrol med anvendelse af en forbindelse af samme kemiske stofklasse som teststoffet.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes en række forskellige koncentrationer af teststoffet, således at der frembringens koncentrationsafhængige toksiske virkninger. Den højeste koncentration bør medføre en lav overlevelsesgrad, og overlevelsesgraden ved den laveste koncentration bør være af samme størrelsesorden som ved det negative kontrolforsøg. Stoffer, som er relativt uopløselige i vand, testes under anvendelse af passende fremgangsmåder op til opløselighedsgrænsen. Den højeste koncentration af ikke-toksiske teststoffer, som er frit opløselige i vand, fastlægges fra test til test.

Fremgangsmåde

Cellerne eksponeres i en passende periode afhængig af det anvendte testsystem. Dette kan indebære gentagne doseringer med udskiftning af medium (og om nødvendigt ny metabolisk aktivering), hvis der er tale om langvarig eksponering. Celler, hvis endogene metaboliske aktivering er utilstrækkelig, testes både med og uden et passende metabolisk aktiveringssystem. Efter eksponeringen vaskes cellerne frie for teststof, hvorefter de dyrkes med henblik på at lade den transformerede fænotype, testen bygger på, komme til udtryk og med henblik på bestemmelse af transformationsfrekvensen.

Alle resultater efterprøves i et uafhængigt forsøg.

2. DATA

Data opstilles i tabelform og kan foreligge i forskellige former afhængigt af den anvendte test. Der kan f.eks. være tale om optælling på plader, registrering af positive plader eller antal transformerede celler. Når det er relevant, udtrykkes overlevelsesgraden som en procentdel af overlevelsen i kontrolforsøgene, og transformationsfrekvensen udtrykkes som antal transformerede celler pr. overlevende.

Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- den anvendte celletype, antal cellekulturer, metoder til opretholdelse af cellekulturer
- forsøgsbetingelser: teststofkoncentration, anvendt vehikel, inkubationstemperatur, inkubationstid, eksponeringens varighed og frekvens, celletæthed under eksponeringen, det anvendte eksogene metaboliske aktiveringssystem, positiv og negativ kontroller, specifikation af den fænotype testen bygger på, det anvendte selektive system (hvis et sådant er anvendt), begrundelse for valget af doser

— metoder til registrering af levedygtige og transformerede celler

— statistisk evaluering

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. **Evaluering og fortolkning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. **REFERENCER**

Se den generelle indledning til afsnit B.

B. 22

DOMINANT LETAL TEST — GNAVER

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Dominante letale virkninger forårsager, at fostret dør. Nå der ved eksponering for kemiske forbindelser induceres dominante letale mutationer, er dette et tegn på, at forsøgsdyreartens kønscellevæv er blevet afficeret. Der er bred enighed om, at dominante letale gener opstår på grund af kromosomskader (strukturelle og numeriske anomalier). Hvis eksponerede hunners afkom dør på det embryonale stade, kan dette også skyldes toksiske virkninger.

Normalt eksponeres hanner for teststoffet, hvorefter de parres med ueksponerede jomfruelige hunner. Kønscellernes forskellige stadier kan undersøges separat ved anvendelse af på hinanden følgende parringsperioder. Forøgelsen af antallet af døde implantater pr. hun i den eksponerede gruppe i forhold til antallet af døde implantater pr. hun i kontrolgruppen er udtryk for den letale virkning efter implantation. Den letale virkning før implantation kan vurderes på grundlag af optælling af corpora lutea eller ved sammenligning af det totale antal implantater pr. hun i de eksponerede grupper og kontrolgruppen. Den totale dominante letale virkning er summen af de letale virkninger før og efter implantation. Beregningen af den totale dominante letale virkning baseres på sammenligning af antallet af levende implantater pr. hun i forsøgsgruppen og antallet af levende implantater pr. hun i kontrolgruppen. Fald i antallet af implantater i bestemte tidsperioder kan skyldes celledrab (af spermatocytter og/eller spermatogonier).

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Hvis det er muligt, opløses eller suspenderes teststoffet i fysiologisk saltvand. Kemiske forbindelser, som er uopløselige i vand, opløses eller suspenderes i egnede vehikler. Det anvendte vehikel bør ikke interferere med teststoffet eller have nogen toksisk virkning. Testopløsningen anvendes umiddelbart efter fremstillingen.

Forsøgsbetingelser

Administrationsmåde

Normalt gives hele dosis på en gang. Der kan også anvendes dosering ad flere gange, når der er toksikologisk begrundelse herfor. Sædvanligvis indgives teststoffet ved oral intubering eller intraperitoneal injektion. Der kan også benyttes andre former for indgift.

Forsøgsdyr

Rotter eller mus anbefales som forsøgsdyr. Sunde og fuldt kønsmodne dyr fordeles randomiseret i forsøgs- og kontrolgrupper.

Antal og køn

Der anvendes et passende antal hanner under hensyntagen til den spontane variation i den biologiske egenskab, der danner grundlag for testen. Det valgte antal baseres på den på forhånd fastlagte testfølsomhed og signifikansstyrke. I et typisk forsøg vil antallet af hanner være tilstrækkeligt til, at mellem 30 og 50 hunner bliver drægtige i hver parringsperiode.

Negative og positive kontroller

Normalt foretages sideløbende positiv og negativ (vehikel) kontrol i hvert forsøg. Når der foreligger acceptable positive kontrolresultater fra nyligt foretagne forsøg i samme laboratorium, kan disse dog anvendes i stedet for sideløbende positiv kontrol.

Positive kontrolstoffer anvendes i tilstrækkeligt lave doser (f.eks. MMS, i.p., 10 mg/kg) til at vise testens følsomhed.

Dosisniveauer

Der anvendes normalt tre forskellige dosisniveauer. Den største dosis bør forårsage tegn på toksisk virkning eller nedsætte de eksponerede dyrs fertilitet. I nogle tilfælde vil et enkelt højt dosisniveau være tilstrækkeligt.

Grænsetest

Når der er tale om ikke-toksiske stoffer, testes en enkeltdosis på 5 g/kg eller gentagen indgift af 1 g/kg/dag.

Fremgangsmåde

Der kan anvendes flere forskellige doseringsskemaer. Normalt gives hele dosis på en gang, men andre skemaer lader sig også anvende.

Hannerne parres efter doseringen individuelt med en eller to ikke-doserede jomfruelige hunner i på hinanden følgende perioder af passende længde. Hunnerne placeres hos hannerne i en periode svarende til mindst en ægcyklus, eller indtil parringen har fundet sted, hvilket konstateres ved tilstedeværelse af sperma i vagina eller en vaginalprop.

Antallet af parringer efter doseringen fastlægges på grundlag af doseringsskemaet, som skal sikre, at alle kønscellestadier er repræsenteret efter doseringen.

Hunner aflives i anden halvdel af drægtighedsperioden, og uterus' indhold undersøges med henblik på bestemmelse af antallet af levende og døde implantater. Ovarierne undersøges med henblik på bestemmelse af antallet af corpora lutea.

2. DATA

Data opstilles i tabelform med angivelse af antal hanner samt antal drægtige og ikke drægtige hunner. Resultaterne af hver enkelt parring, herunder identificering af hver enkelt han og hun anføres individuelt. For hver hun anføres parringsuge, hannens dosis og antallet af levende og døde implantater. Beregningen af den totale dominante letale virkning baseres på sammenligning af antallet af levende implantater pr. hun i forsøgsgruppen og antallet af levende implantater pr. hun i kontrolgruppen. Forholdet mellem døde og levende implantater i forsøgsgruppen sammenlignes med forholdet i kontrolgruppen med henblik på bestemmelse af den letale virkning efter implantation.

Hvis data registreres som tidlige og sene dødsfald, skal dette fremgå af tabellerne. Hvis der foretages vurdering af den letale virkning før implantation, anføres denne. Den letale virkning før implantation kan beregnes som forskellen mellem antallet af corpora lutea og antallet af implantater eller som et lavere gennemsnitligt antal implantationer pr. uterus i forhold til kontrolparringerne.

Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— dyreart, stamme, de anvendte dyrs alder og vægt, antal dyr af hvert køn i forsøgs- og kontrolgrupperne

— teststof, bærestof, de anvendte dosisniveauer og begrundelse for valget af disse, negativ og positiv kontrol, toksicitetsdata

— administrationsmåde og doseringens varighed

— parringsskema

— metode til konstatering af, om parring har fundet sted

— aflivningstidspunkt

— kriterier for registrering af dominante letale gener

— om muligt dosis-responsforhold

— statistisk evaluering

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Evaluering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. REFERENCER

Se den generelle indledning til afsnit B.

B.23 TEST FOR KROMOSOMABERRATIONER I SPERMATOGONIER HOS PATTEDYR

1. **METODE**

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 483 "Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test" (1997).

1.1 INDLEDNING

Formålet med in vivo-testen for kromosomaberrationer i spermatogonier hos pattedyr er et påvise, om et stof forårsager strukturelle kromosomafvigelser i spermatogonier fra pattedyr (1)(2)(3)(4)(5). Der er to typer strukturændringer, kromosomtypen og kromatidtypen. De fleste kemiske mutagener forårsager ændringer af kromatidtypen, men også ændringer af kromosomtypen forekommer. Den foreliggende metode er ikke beregnet til at påvise antalsafvigelser og benyttes ikke rutinemæssigt til dette formål. Kromosommutationer og lignende er årsag til mange genetiske sygdomme hos mennesker.

Ved denne test måles kromosomhændelser i spermatogonier, og den forventes derfor at kunne forudsige induktion af arvelige mutationer i kimceller.

Der benyttes rutinemæssigt gnavere i denne test. Ved denne cytogenetiske in vivo-test påvises kromosomaberrationer ved spermatogoniers mitose. Metoden omfatter ikke andre målceller.

For at påvise aberrationer af kromatidtypen i spermatogonier må den første mitotiske celledeling efter behandlingen undersøges, inden eventuelle skader går tabt ved efterfølgende celledelinger. Der kan indhentes yderligere information fra behandlede spermatogonstamceller ved meiotisk kromosomanalyse for aberrationer af kromosomtypen ved diakinese-metafase I, når de behandlede celler bliver til spermatocytter.

Denne in vivo-test er tilrettelagt til at vise, om stoffer, der er mutagene over for somatiske celler, også er aktive i kimceller. Derudover er spermatogontesten relevant for en vurdering af den reelle mutagenicitetsfare, idet der tages hensyn til sådanne faktorer som in vivo-metabolisme, farmakokinetik og DNA-reparationsprocesser.

I testiklerne er der flere generationer af spermatogonier til stede, som udviser forskellig følsomhed over for kemisk behandling. På denne måde repræsenterer de påviste aberrationer den samlede reaktion fra behandlede spermatogonpopulationer, hvor resultatet domineres af de mere talrige differentierede spermatogonier. Forskellige generationer af spermatogonier er, alt efter deres placering i testiklerne, i varierende grad i berøring med det almindelige kredsløb på grund af den fysiske og fysiologiske Sertoli-cellebarriere og blod-testikel-barrieren.

Hvis der er grund til at tro, at teststoffet eller en reaktiv metabolit ikke vil nå frem til målvævet, er denne test ikke egnet.

Se også den generelle indledning til afsnit B.

1.2 DEFINITIONER

Aberration af kromatidtypen: beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på enkeltkromatider eller brud på og sammenføjning af kromatider.

Aberration af kromosomtypen: beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på - eller brud på og sammenføjning af - begge kromatider på samme sted.

Gap: en akromatisk beskadigelse, som er mindre end ét kromatid bred, og hvor misalignment af kromatiderne er minimal.

Antalsafvigelse: ændring i kromosomtallet i forhold til det for de pågældende dyr normale antal.

Polyploidi: et multiplum af det haploide kromosomtal (n), som ikke er det diploide tal (dvs. 3n, 4n, osv.).

Strukturel ændring: ændring i kromosomstrukturen, som kan iagttages ved mikroskopi i celledelingens metafase i form af deletioner, intrachange og interchange.

1.3 TESTMETODENS PRINCIP

Dyrene udsættes for teststoffet på passende måde og aflives efter passende tidsrum efter eksponeringen. Inden aflivningen behandles dyrene med et metafasestandsende stof (f.eks. colchicin eller Colcemid®). Der fremstilles derefter præparater af kimceller, som farves, og metafasecellerne undersøges for kromosomaberrationer.

1.4 BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1 **Præparater**

1.4.1.1 *Valg af dyreart*

Der benyttes sædvanligvis hanmus og -hamstere, selv om hanner af andre egnede pattedyrarter kan benyttes. Der bør anvendes almindeligt brugte laboratoriestammer af unge sunde voksne dyr. Ved undersøgelsens begyndelse bør vægtvariationen mellem dyrene være mindst mulig og ikke over ± 20% af gennemsnitsvægten.

1.4.1.2 *Miljø og fodring*

Der gælder de almindelige forhold som beskrevet i den generelle indledning til afsnit B, blot bør der tilstræbes en fugtighed på 50-60%.

1.4.1.3 *Forberedelse af dyrene*

Der udvælges tilfældigt sunde unge voksne handyr til kontrol- og behandlingsgruppen. Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning. Dyrene identificeres entydigt. Dyrene tilvænnes til laboratorieforholdene i mindst 5 dage.

1.4.1.4 *Fremstilling af doser*

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærere og fortyndes passende, inden de gives til dyrene. Teststoffer i væskeform kan enten gives direkte til dyrene eller fortyndes først. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

1.4.2 **Testbetingelser**

1.4.2.1 *Opløsningsmiddel/bærer*

Opløsningsmiddel/bærer må ikke have toksiske virkninger ved de benyttede doser og må ikke mistænkes for at reagere kemisk med teststoffet. Benyttes der andre opløsningsmidler/bærere end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærersystem.

1.4.2.2 *Kontrolgrupper*

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærer) kontrolgrupper. Bortset fra behandling med teststof skal dyrene i kontrolgrupperne behandles på samme måde som dyrene i behandlingsgrupperne.

Positive kontrolprøver skal frembringe strukturelle ændringer i spermatogonier in vivo ved en dosis, der forventes at give en påviselig forøgelse i forhold til baggrundsværdierne.

Der vælges sådanne doser i de positive kontrolprøver, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede objektglas's identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser dem. Det kan accepteres, at den positive kontrol indgives på anden måde end teststoffet, og at der kun foretages én prøveudtagning. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer. Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolstoffer:

Stof	**CAS nr.**	**EINECS nr.**
Cyclophosphamid Cyclophosphamid monohydrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Cyclohexylamin	108-91-8	203-629-0
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Monomer acrylamid	79-06-1	201-173-7
Triethylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Der skal ved hver prøveudtagning indgå negative kontroldyr, som kun er behandlet med opløsningsmiddel eller bærer, og ellers behandlet på samme måde som behandlingsgrupperne, medmindre tidligere kontroldata har vist en acceptabel variation mellem dyr indbyrdes og acceptabel hyppighed af celler med kromosomafvigelser. Desuden skal der være ubehandlede kontrolgrupper, medmindre der foreligger tidligere opnåede eller offentliggjorte kontroldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

1.5 FREMGANGSMÅDE

1.5.1 **Dyrenes antal**

Hver behandlet gruppe og kontrolgruppe skal bestå af mindst 5 analyserbare handyr.

1.5.2 **Behandlingsplan**

Teststofferne indgives fortrinsvis ad én eller to gange (dvs. som én behandling eller to behandlinger). De kan også indgives i to deldoser, dvs. to behandlinger samme dag med kun nogle få timers interval, hvorved det bliver lettere at indgive et større materialevolumen. Indgift på anden måde skal begrundes sagligt.

I gruppen med højeste dosis udtages der prøver på to tidspunkter efter behandling. Da teststoffet kan indvirke på cellecyklussens kinetik, udtages der er tidlig og en sen prøve, nemlig ca. 24 timer og ca. 48 timer efter behandlingen. For alle andre doser end den højeste dosis udtages en prøve 24 timer eller 1,5 gange cellecyklus efter behandlingen, medmindre et andet prøveudtagningstidspunkt vides at være bedre egnet til påvisning af virkninger (6).

Der kan desuden udtages prøver på andre tidspunkter. For kemikalier, der kan fremkalde kromsom-lagging eller have S-uafhængige virkninger, kan tidligere prøveudtagning være hensigtsmæssigt (1).

Det vurderes i det enkelte tilfælde, om en behandlingsplan med gentagen indgift er velegnet. Ved behandling med gentagen indgift aflives dyrene 24 timer (1,5 cellecykluslængde) efter sidste behandling. Der kan udtages yderligere prøver, hvis det er hensigtsmæssigt.

Inden aflivningen gives dyrene en intraperitoneal injektion med en passende dosis metafasestandsende stof (f.eks. Colcemid® eller colchicin). Der udtages prøver af forsøgsdyr efter et passende tidsrum. For mus er dette tidsrum ca. 3-5 timer, for hamster ca. 4-5 timer.

1.5.3 **Dosisniveauer**

Hvis der gennemføres en forprøve til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger nogen egnede data, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme og behandlingsmåde som agtes benyttet i hoved-undersøgelsen (7). Er der tale om toksicitet, benyttes der tre dosisniveauer for første prøveudtagningstidspunkt. Disse dosisniveauer skal dække et interval fra maksimal toksicitet til næsten ingen eller ingen toksicitet. Ved den efterfølgende prøveudtagning behøves kun den højeste dosis benyttet. Den højeste dosis defineres som den dosis, der fremkalder sådanne tegn på toksicitet, at højere dosis med samme indgiftsmønster må forventes at medføre død.

Stoffer med specifik biologisk aktivitet ved lav ikke-toksisk dosis (f.eks. hormoner og mitogener) kan danne undtagelser fra disse dosisfastsættelseskriterier og bør evalueres individuelt. Højeste dosis kan også defineres som en dosis, der i nogen grad udviser tegn på toksicitet i spermatogonier (f.eks. et lavere forhold mellem spermatogonmitoser og første og anden meiosemetafaser; faldet på ikke være større end 50%).

1.5.4 **Grænsetest**

Hvis der ved en test med én dosis på mindst 2000 mg pr. kg legemsvægt indgivet ved én eller i to behandlinger på samme dag, ikke kan iagttages nogen toksiske virkninger, og hvis man på grundlag af data om strukturmæssigt beslægtede stoffer ikke forventer gentoksicitet, kan en fuldstændig undersøgelse med tre dosisniveauer anses for unødvendig. Den forventede eksponering af mennesker kan foranledige, at der benyttes en højere dosis i grænsetesten.

1.5.5 **Indgift af doser**

Teststoffet indgives normalt ved tvangsfodring med sonde eller en passende intubationskanyle eller ved intraperitoneal injektion. Andre indgiftsmåder kan accepteres, hvis de kan begrundes. Hvor stor en væskemængde, der kan indgives ad gangen ved tvangsfodring eller injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Mængden bør højst være på 2 ml pr. 100 g legemsvægt. Anvendelse af større rumfang skal begrundes. Bortset fra lokalirriterende og ætsende stoffer, som normalt vil have kraftigere virkninger ved højere koncentrationer, bør testvolumenet variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så volumenet bliver det samme ved alle dosisniveauer.

1.5.6 **Præparering af kromosomer**

Umiddelbart efter aflivningen udtages der celleopslæmninger fra en eller begge testikler, som udsættes for hypotonisk væske og fikseres. Derefter stryges cellerne ud på objektglas og farves.

1.5.7 **Analyse**

For hvert dyr bør mindst 100 godt fordelte metafaseceller analyseres (dvs. mindst 500 metafaseceller pr. gruppe). Dette antal kan sættes ned, hvis der iagttages et stort antal aberrationer. Alle objektglas, herunder positive og negative kontrolprøver, kodes uafhængigt inden mikroskoperingen. Da fikseringen ofte medfører, at en del af metafasecellerne går i stykker og kromosomerne går tabt, bør bedømte celler indeholde et antal centromerer svarende til kromosomtallet 2n ±2.

2. **DATA**

2.1 BEHANDLING AF RESULTATER

Data for de enkelte dyr præsenteres i tabelform. Forsøgsenheden er et dyr. For hvert dyr registreres antallet af celler med strukturelle kromosomaberrationer, og antallet af kromosomaberrationer pr. celle bedømmes. Forskellige typer strukturelle kromosomaberrationer skal anføres med antal og hyppighed for behandlingsgrupper og kontrolgrupper. Gaps registreres særskilt og oplyses, men medregnes ikke generelt i den totale aberrationshyppighed.

Hvis der iagttages såvel mitose som meiose, bestemmes forholdet mellem spermatogonmitoser og første og anden meiosemetafase som et mål for cytotoksiciteten for alle behandlede dyr og negative kontroldyr i en samlet prøve på 100 celler under deling for hvert dyr. Hvis der kun iagttages mitose, bestemmes mitoseindekset i mindst 1000 celler for hvert dyr.

2.2 EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Der findes en række kriterier for afgøre, om et resultat er positivt, f.eks. en dosisafhængig forøgelse af andelen af celler med kromosomaberrationer eller en tydelig forøgelse af antallet af celler med aberrationer hos en enkeltdosisgruppe på et bestemt prøveudtagningstidspunkt. Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne (8). Statistisk signifikans bør ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere test, helst med ændring af forsøgsbetingelserne.

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagent i dette system.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en in vivo-test for kromosomaberrationer i spermatogonier hos pattedyr viser, at teststoffet fremkalder strukturelle kromosomaberrationer i kimceller hos den undersøgte art. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke fremkalder strukturelle kromosomaberrationer i kimceller hos den undersøgte art.

Sandsynligheden for, at teststoffet eller dets metabolitter når frem til målvævet, bør diskuteres.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærer:

- begrundelse for valg af bærer
- teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærer, hvis den kendes

Forsøgsdyr:

- anvendt art/stamme
- antal dyr og deres alder
- oprindelse, miljø, føde, mv.
- de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse, samt interval, gennemsnit og standardafvigelse for legemsvægten for hver enkelt gruppe

Testbetingelser:

- data fra en eventuel forprøve til bestemmelse af dosisinterval
- begrundelse for valg af dosisniveau
- begrundelse for indgiftsvej
- detaljerede oplysninger om præparering af teststoffet
- detaljerede oplysninger om indgift af teststoffet
- begrundelse for aflivningstidspunkter
- eventuel omregning fra teststofkoncentration (ppm) i føde/drikkevand til faktisk dosis (mg pr. kg legemsvægt pr. dag)
- detaljerede oplysninger om føde- og vandkvalitet
- detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøveudtagningsplan
- metoder til måling af toksicitet
- det metafasestandsende stofs betegnelse og koncentration og behandlingens varighed
- metoder til præparering af objektglas
- kriterier for bedømmelse af aberrationer
- antal analyserede celler pr. dyr
- kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

Resultater:

- tegn på toksicitet
- mitoseindeks
- forholdet mellem spermatogonmitoser og første og anden meiosemetafase
- antal aberrationer og type, anført særskilt for hvert dyr
- samlet antal aberrationer pr. gruppe
- antal celler med aberrationer pr. gruppe
- dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt
- eventuelle statistiske analyser
- data for sideløbende negative kontrolprøver
- data for tidligere negative kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser
- data for sideløbende positive kontrolprøver
- eventuelt iagttagne ploidiændringer.

Diskussion af resultaterne.

Konklusioner

4. REFERENCER

1. Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C., Lambert, B. and Magnusson, J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.

2. Adler, I.D., (1984). Cytogenetic tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J.M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

3. Evans, E.P., Breckon, G. and Ford, C.E., (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.

4. Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

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

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

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

8. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

B. 24

SPOTTEST — MUS

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Principper for testmetoden

Spottesten er en in vivo test i mus, hvor musefostre på det embryonale stade eksponeres for kemiske forbindelser. Målcellerne i fostrene er melanoblasterne, og målgenerne er de gener, der bestemmer pelshårenes pigmentering. Fostrene er heterozygote i et antal af disse pelsfarvegener. Ved mutation eller tab af det dominante allel i en melanoblast ved en række genetiske hændelser kommer den recessive fænotype til udtryk i de celler, der dannes fra denne stamcelle, hvilket fører til anderledes farvede pletter i musens pels. Mængden af afkom med sådanne pletter, dvs. mutationer, registreres og sammenlignes med den tilsvarende mængde blandt afkom af hunmus, der kun har været eksponeret for opløsningsmidlet. Ved spottesten i mus konstateres formodede somatiske mutationer i fosterceller.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Teststoffet opløses eller suspenderes så vidt muligt i isotonisk saltvand. Kemiske forbindelser, som er uopløselige i vand, opløses eller suspenderes i passende vehikler. Det anvendte vehikel må ikke indvirke på teststoffet eller forårsage toksiske effekter. Fremstillingen af teststofpræparationen foretages umiddelbart inden anvendelsen.

Forsøgsdyr

Mus af stammen T-stock (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye, $c^{ch}p/c^{ch}p$; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) parres med enten stammen HT-stock (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, ln fz/ln fz; pearl pe/pe) eller C57 BL (nonagouti, a/a). Andre egnede krydsninger som NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) og DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute, d/d) kan anvendes, under forudsætning af, at afkommet er nonagouti.

Antal og køn

Der anvendes et antal drægtige hunner, som er tilstrækkeligt stort til, at der produceres en passende mængde afkom for hver af de anvendte doser. Holdstørrelsen kan anslås på grundlag af antallet af observerede pletter hos de eksponerede mus og kontroldatas størrelsesorden. Et resultat kan først accepteres som negativt, hvis mindst 300 unger af hunner, som har været eksponeret for den største dosis, er undersøgt.

Positive og negative kontroller

Der foretages sideløbende kontrol med mus som kun eksponeres for vehikel (negativ kontrol). Historiske kontroldata fra samme laboratorium kan, under forudsætning af at der er tale om homogene data, indregnes med

henblik på at forøge testens sensitivitet. Der bør foreligge positive kontroldata fra nyligt foretagne forsøg i samme laboratorium med en kemisk forbindelse, som vides at være mutagen i denne test, i tilfælde af at der ikke konstateres nogen mutagen virkning af teststoffet.

Administrationsmåde

Sædvanligvis indgives teststoffet ved oral intubering eller intraperitoneal injektion i de drægtige hunner. Inhalation og andre administrationsmåder kan anvendes, hvis de er hensigtsmæssige.

Dosisniveauer

Der anvendes mindst to doseringer, hvoraf den ene skal medføre tegn på toksisk virkning eller reduceret kuldstørrelse. Ikke-toksiske stoffer testes under anvendelse af så store doser som praktisk muligt.

Fremgangsmåde

Normalt gives forsøgsdyrene hele dosis på en gang på drægtighedsperiodens dag 8, 9 eller 10, idet dag 1 er den dag, vaginalproppen observeres første gang. Disse dage svarer til 7,25, 8,25 og 9,25 dage efter befrugtningen. Gentagne doseringer kan foretages på disse dage.

Analyse

Afkommet blindkodes og eventuelle pigmenterede pletter registreres mellem tre og fire uger efter fødslen. Der skelnes mellem tre typer pletter:

a) hvide pletter inden for en afstand af 5 mm fra den ventrale midtlinie; disse pletter antages at være et resultat af celledrab (WMVS)

b) gule agouti-agtige pletter på eller omkring pattevorter, kønsåbninger, strube, axiller, lyske og midt i panden; disse pletter antages at være et resultat af fejldifferentiering (MDS)

c) pigmenterede og hvide pletter tilfældigt fordelt i pelsen; disse pletter antages at være et resultat af somatiske mutationer (RS).

Alle tre typer registreres, men kun den sidstnævnte, RS, er genetisk relevant. Hvis der er problemer med at skelne mellem MDS og RS, kan der benyttes fluorescensmikroskopi af hårprøver.

Synlige morfologiske abnormiteter hos afkommet registreres også.

2. DATA

Det samlede antal undersøgte unger og antal unger med en eller flere pletter, som antages at være et resultat af somatisk mutation, anføres. Data fra forsøgsgrupper og negativ kontrolgruppe sammenlignes ved hjælp af egnede statistiske metoder. Data anføres også pr. kuld.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapporten

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— de anvendte stammer

— antal drægtige hunner i forsøgs- og kontrolgrupperne

— den gennemsnitlige kuldstørrelse i forsøgs- og kontrolgrupperne ved fødslen, og når ungerne er vænnet fra

— dosisniveauer

— opløsningsmiddel

— den dag i drægtighedsperioden, hvor doseringen finder sted

— administreringsform

— det samlede antal undersøgte unger og antal unger med WMVS, MDS og RS i forsøgs- og kontrolgrupperne

— makroskopiske morfologiske abnormiteter

— om muligt dosis-responsforhold for RS

— statistisk evaluering

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. **Evaluering og fortolkning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. **REFERENCER**

Se den generelle indledning til afsnit B.

B. 25

ARVELIG TRANSLOKATION HOS MUS

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Ved test af arvelig translokation hos mus konstateres strukturelle og numeriske kromosomforandringer i pattedyrskønsceller udtrykt i førstegenerations afkom. Kromosomforandringerne, der måles, er reciprokke translokationer, og, når afkommet også omfatter hundyr, tab af et X-kromosom. Bærere af translokationer og XO-hunner har nedsat fertilitet, hvilket udnyttes ved udvælgelsen af F_1-afkom med henblik på cytogenetisk analyse. Visse typer translokationer (X-autosome og c-t-typen) forårsager fuldstændig sterilitet. Translokationer konstateres cytogenetisk i meiosens diakinese-metafase I hos hanner, som enten kan være af F_1-generationen eller sønner af F_1-hunner. XO-hunner identificeres cytogenetisk ved, at kromosomtallet i knoglemarvmitoser kun er 39.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Teststoffet opløses i isotonisk saltvand. Uopløselige stoffer opløses eller suspenderes i egnede vehikler. Teststofopløsning anvendes umiddelbart efter fremstillingen. Hvis der anvendes et vehikel med henblik på at lette doseringen, må det ikke interferere med teststoffet eller have nogen toksisk virkning.

Administrationsmåde

Sædvanligvis indgives teststoffet ved oral intubering eller intraperitoneal injektion. Andre administrationsmåder kan være hensigtsmæssige.

Forsøgsdyr

Som forsøgsdyr benyttes mus, idet disse giver de letteste betingelser med hensyn til avl og cytologisk verifikation. Der kræves ikke nogen bestemt stamme. Hvis det påregnes at teste fertiliteten, bør den anvendte stammes gennemsnitlige kuldstørrelse være over otte og relativt konstant. Der anvendes sunde kønsmodne dyr.

Antal dyr

Det nødvendige antal dyr afhænger af den spontane translokationsfrekvens og den induktionsfrekvens, som er nødvendig for at opnå et positivt resultat.

Normalt gennemføres testen ved undersøgelse af F_1-hanner. Der undersøges mindst 500 F_1-hanner pr. dosis. Hvis der tillige anvendes F_1-hunner, undersøges 300 af hvert køn.

Negative og positive kontroller

Adækvate kontroldata, stammende fra sideløbende og historiske kontrolforsøg, skal være tilgængelige. Når der foreligger acceptable positive kontrolresultater fra undersøgelser foretaget for nyligt i det samme laboratorium, kan disse anvendes i stedet for en sideløbende positiv kontrol.

Dosisniveauer

Der testes en dosis, normalt den største dosis med minimal toksisk virkning, men uden indflydelse på reproduktion eller overlevelse. Hvis dosis-responsforholdet skal bestemmes, anvendes yderligere to mindre doser. Ikke-toksiske stoffer testes under anvendelse af så store doser som praktisk muligt.

Fremgangsmåde

Eksponering og parring

Der kan anvendes to forskellige eksponeringsskemaer. I det hyppigst anvendte skema gives hele dosis på en gang. Teststoffet kan også gives syv dage om ugen i 35 dage. Antallet af parringer efter eksponeringen afhænger af eksponeringsskemaet og skal være stort nok til at sikre, at alle eksponerede kønscellestadier kan undersøges. Efter parringen placeres hunnerne i hver sit bur. Ved fødslen registreres dato, kuldstørrelse og afkommets køn. Alle hanner blandt afkommet vænnes fra og hunnerne frasorteres, medmindre de medtages i forsøget.

Test af heterozygoti efter translokation

Der anvendes en af to mulige metoder:

— fertilitetsundersøgelse af F_1-generationen med efterfølgende verifikation af mulige translokationsbærere ved hjælp af cytogenetisk analyse

— cytogenetisk analyse af alle F_1-hanner uden forudgående udvælgelse på grundlag af fertilitetsundersøgelser.

a) Fertilitetsundersøgelse

Nedsat fertilitet hos F_1-generationens medlemmer kan konstateres ved observation af kuldstørrelsen og/eller analyse af de parrede hundyrs uterusindhold.

Forinden fastlægges der kriterier for normal og nedsat fertilitet hos den anvendte stamme.

Observation of kuldstørrelse: De F_1-hanner, som skal undersøges, placeres i hver sit bur sammen med hunner fra samme forsøg eller fra bestanden. Fra og med 18 dage efter parringen iagttages burene dagligt. Kuldstørrelse og køn i F_2-generationen registreres ved fødslen, hvorefter kuldene fjernes. Hvis der testes F_1-hunner, bevares de små F_2-kuld med henblik på yderligere undersøgelser. Konstatering af, om hunner er translokationsbærere, forgår ved cytogenetisk analyse af translokation hos en vilkårlig han blandt deres afkom. XO-hunner identificeres gennem ændring af forholdet mellem hanner og hunner i deres afkom fra 1:1 til 1:2. Ved en sekventielt ordnet fremgangsmåde elimineres normale F_1-dyr fra den videre undersøgelse, hvis størrelsen af det første F_2-kuld er lig med eller højere end en på forhånd fastsat normalværdi. I modsat fald observeres det andet eller tredje F_2-kuld. F_1-dyr, der ikke kan klassificeres som normale efter observation af op til tre F_2-kuld underkastes enten yderligere undersøgelse ved analyse af de parrede hunners uterusindhold eller ved direkte cytogenetisk analyse.

Analyse af uterusindholdet: Den nedsatte kuldstørrelse hos translokationsbærere skyldes, at fostrene dør på det embryonale stade, så et stort antal døde implantater tyder på translokation hos forsøgsdyret. De F_1-hanner, som skal undersøges, parres hver især med to til tre hunner. Ved daglig undersøgelse mellem kl. 10 og 12 om formiddagen af forekomsten af vaginalprop, konstateres det, om befrugtning har fundet sted. Hunnerne aflives 14 til 16 dage senere, og antallet af levende og døde implantater i uteri registreres.

b) Cytogenetisk analyse

Der fremstilles testikelpræparater ved lufttørringsteknik. Translokationsbærere identificeres på grundlag af multivalente konfigurationer i primære spermatocytters diakinese-metafase I. Hvis der observeres mindst to celler med multivalente konfigurationer betragtes det som bevist, at forsøgsdyret er translokationsbærer.

Når der ikke gennemføres udvælgelse på basis af fertilitetsundersøgelser, undersøges alle F_1-hanner cytogenetisk. Der foretages mikroskopisk undersøgelse af mindst 25 diakinesemetafaser I pr. han. F_1-hanner med små testikler og defekt meiose, som standser før diakinesen, samt F_1-hunner, som formodes at være XO-bærere, underkastes undersøgelse af mitotiske metafaser i spermatogonier eller knoglemarv. Hvis der observeres usædvanlig lange og/eller korte kromosomer i ti celler, betragtes det som påvist, at der er tale om en translokation, som gør hanner sterile (c-t-typen). Visse X-autosome translokationer, som gør hanner sterile, kan kun identificeres ved båndanalyse af mitosekromosomer. Hvis der observeres 39 kromosomer i ti mitoser, betragtes det som påvist, at der er tale om en XO-hun.

2. DATA

Data opstilles i tabelform.

Den gennemsnitlige kuldstørrelse og kønsfordeling i forældregenerationens afkom ved fødslen og ved afvænningen angives for hver parringsperiode.

Med henblik på vurdering af F_1-dyrenes fertilitet anføres den gennemsnitlige kuldstørrelse efter de normale parringer og hver enkelt kuldstørrelse efter parring af F_1-translokationsbærere. Efter analyse af uterusindhold anføres det gennemsnitlige antal levende og døde implantater efter normale parringer og antallet af levende og døde implantater efter hver enkelt parring af F_1-translokationsbærere.

Efter cytogenetisk analyse af diakinese-metafaser I anføres antallet af multivalente konfigurationer og det totale antal undersøgte celler for hver enkelt translokationsbærer.

Det samlede antal parringer og parringsperiodernes længde anføres for sterile F_1-dyr. Der gives detaljerede oplysninger om testikelvægt og cytogenetisk analyse.

Den gennemsnitlige kuldstørrelse, F_2-afkommets kønsfordeling og resultaterne af den cytogenetiske analyse anføres for XO-hunner. Hvis mulige F_1-translokationsbærere udvælges ved fertilitetsundersøgelser, skal tabellerne indeholde oplysninger om, hvor mange af de udvalgte dyr der senere viste sig at være heterozygote efter translokation.

Data fra negative og positive kontrolforsøg rapporteres på lignende måde.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— stamme, dyrenes alder, de doserede dyrs vægt, antal dyr af hvert køn i forsøgs- og kontrolgrupperne i forældregenerationen

— antal af forældredyr af hvert køn i forsøgs- og kontrolgrupper

— forsøgsbetingelser, detaljeret beskrivelse af dyrenes behandling, dosisniveau, opløsningsmidler, parringsskema

— afkommets antal og køn for hver enkelt hun, antal og køn af afkom, som opdrættes med henblik på translokationsanalyse

— translokationsanalytiske kriterier og analysetidspunkt

— antal translokationsbærere samt detaljeret beskrivelse af disse, herunder avlingsdata og oplysninger om uterusindhold, hvis sådanne foreligger

— cytogenetisk fremgangsmåde og detaljerede oplysninger om den mikroskopiske analyse, helst vedlagt billeder

— statistisk evaluering

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Evaluering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. REFERENCER

Se den generelle indledning til afsnit B.

B.26 SUBKRONISK ORAL TOKSICITETS-TEST

ET 90-DAGES FORSØG OVER GENTAGNE ORALE DOSERS TOKSICITET PÅ GNAVERE

1. **METODE**

Denne metode til udførelse af en subkronisk oral toksicitets-test svarer til OECD TG 408 (1998)

1.1 INTRODUKTION

Efter at en akut eller gentagen 28-dages toksicitets-test er udført med henblik på primær vurdering af et kemisk stofs toksicitet, kan man udføre en subkronisk oral toksicitets-test, hvor man anvender gentagne doser til bestemmelse og evaluering af stoffets toksiske egenskaber. Undersøgelsen på 90 dage skaffer viden om mulige trusler mod sundheden, som kan opstå ved gentagen belastning i en længere periode, som dækker afvænning, modning og den første del af voksenlivet. Undersøgelsen skaffer viden om større toksiske virkninger, peger på hvilke organer, der rammes, og muligheden for akkumulation; den kan give et overslag over det belastningsniveau, der kan være skadeligt, uden at det bemærkes, som igen kan anvendes til valg af dosis til undersøgelser af kronisk effekt og til fastlæggelse af sikkerhedskriterier for hvad mennesker kan tåle.

Metoden lægger yderligere vægt på virkninger på neurologiske områder og peger på virkninger på det immunologiske og reproduktive system. Nødvendigheden af omhyggelig klinisk observation af dyrene for at opnå størst mulig viden bliver ligeledes understreget. Undersøgelsen skulle muliggøre identifikation af kemikalier med neurotoksiske virkninger og virkninger på det immunologiske og reproduktive system, som kan føre til yderligere dybdegående undersøgelser.

Se også Generel Introduktion, del B.

1.2 DEFINITIONER

Dosis: Mængden af indgivet test-kemikalium. Dosis angives som vægt (g, mg) eller som vægt af test-kemikalium i forhold til dyrets vægt (fx mg/kg) eller en konstant del af føden (ppm).

Dosering: Er et generelt udtryk for dosis, hyppighed af indgift og varigheden af indgiften.

NOAEL: Er en forkortelse for det niveau, der ikke medfører observeret skadelig virkning og er det højeste dosis-niveau, hvor ingen negative virkninger, der kan tilskrives behandlingen, er fundet.

1.3 TEST-METODENS PRINCIP

Test-kemikaliet administreres peroralt dagligt i forskellige doser til forskellige grupper af forsøgsdyr, idet hver gruppe får en bestemt dosis i en periode på 90 dage. I denne periode observeres dyrene nøje for tegn på forgiftning. Dyr, der dør eller aflives, mens testen står på, bliver obduceret og ved undersøgelsens afslutning bliver resten af dyrene aflivet og obduceret.

1.4 BESKRIVELSE AF TEST-METODEN

1.4.1 **Forberedelse af dyrene**

Der anvendes sunde dyr, som er tilvænnet laboratorieforholdene i mindst 5 dage, og som ikke før har været anvendt til eksperimenter. Dyrene beskrives hvad angår art, stamme, hvorfra de kommer ('kilde'), køn, vægt og/eller alder. Dyrenes randomiseres til henholdsvis kontrol og behandlingsgruppe. Bure skal anbringes, så deres placering får mindst mulig betydning. Hvert dyr tildeles eget, særlige identifikationsnummer.

1.4.2 **Fremstilling af doser**

Stoffet, der skal undersøges, indgives gennem sonde eller i føden eller drikkevandet. Måden at indgive på afhænger af undersøgelsens formål og test-materialets fysisk-kemiske egenskaber.

Om nødvendigt opløses eller opslæmmes stoffet i et passende medie. Hvor mulig anbefales det først at forsøge at anvende vandige opløsninger eller opslæmninger; dernæst overvejes opløsninger eller opslæmninger i olie (fx majsolie) og først derefter andre opløsnings/opslæmningsmidler. For andre midler end vand bør de toksiske egenskaber kendes. Tests-kemikaliets stabilitet i forbindelse med indgiften bør fastslås.

1.4.3 **Test-omstændighederne**

1.4.3.1 *Forsøgsdyrene*

Den foretrukne art er rotten, men andre gnaverarter, fx mus, kan anvendes. Almindeligt anvendte laboratoriestammer af unge, sunde voksne dyr bør anvendes. Hundyrene skal ikke have haft unger og ikke være gravide. Indgiften bør begynde snarest efter fravænning, og i hvert fald før dyrene er ni uger gamle. Ved forsøgets begyndelse bør den indbyrdes vægtforskel være minimal og ikke overstige ±20 % af gennemsnittet for hvert køn. Når forsøget foretages som forløber for en længerevarende toksicitetsstudie, bør man i begge forsøg anvende samme stamme og fra samme kilde.

1.4.3.2 *Antal og køn*

Mindst 20 dyr, (ti af hvert køn) bør anvendes for hver dosisniveau. Hvis man planlægger at aflive nogle dyr undervejs i forsøget, skal antallet af dyr, der påbegynder forsøget, forøges tilsvarende. Ud fra tidligere opnået viden om kemikaliet eller nære analoge stoffer bør man overveje en yderligere 'satellit'-gruppe på ti dyr (fem af hvert køn) i kontrollen og i gruppen med den højeste dosis, således at man efter forsøgsperioden kan observere evt. reversibilitet eller vedvarende følger af behandlingen. Varigheden af denne observationsperiode afhænger af, hvilke virkninger man vil følge.

1.4.3.3 *Dosisstørrelse*

Mindst tre dosisstørrelser og en sideløbende kontrol bør anvendes, undtagen i tilfælde af en begrænset test (se 1.4.3.3). Dosisstørrelsen kan afhænge af tidligere tilsvarende forsøg eller forsøg med henblik på opsøgning af dosisgrænser. og skal tage hensyn til kendte toksikologiske og tokso-kinetiske data for test-kemikaliet eller tilsvarende stoffer. Medmindre kemikaliets fysisk-kemiske natur eller biologiske effekt sætter grænser, bør den højeste dosisstørrelse vælges med henblik på toksisk virkning men ikke på død eller alvorlig lidelse. Faldende dosisstørrelse bør vælges med henblik på at påvise en eventuel dosisrelateret virkning og det niveau, der ikke medfører observeret skadelig virkning (NOAEL). To til firedobbelte intervaller er ofte bedst til fastlæggelse af faldende dosisstørrelser og tilføjelse af en fjerde test-gruppe er ofte at foretrække frem for brug af meget store intervaller (fx mere end en faktor på 6-10) mellem dosisstørrelserne.

Kontrolgruppen skal være en ubehandlet gruppe eller en gruppe, der får det eventuelle medie, i hvilket de behandlede dyr får kemikaliet. Bortset fra behandlingen skal dyrene i kontrolgruppen behandles nøjagtigt som dyrene i test-gruppen. Hvis kemikaliet indgives i et medie, skal kontrolgruppen have mediet i den størst anvendte mængde. Hvis test-kemikaliet indgives via foderet og hvis dette medfører reduceret fødeindtagelse, kan det være nyttigt med en gruppe, der parallel-fodres mængdemæssigt, således at et eventuelt vægttab kan tilskrives, at foderet har en dårlig smag, respektive virker toksisk.

Man bør overveje mediets eller eventuelle additivers egenskaber med hensyn til absorption, distribution, stofskifte eller retention af test-kemikalium; virkningen på test-kemikaliets kemiske egenskaber, som igen kan have indflydelse på dets toksiske egenskaber; og indflydelsen på føde- eller vandindtag eller dyrenes ernæringsmæssige tilstand.

1.4.3.4 *Grænse-tests*

Et total-forsøg med tre dosisstørrelser behøves næppe udført, hvis man ikke forventer nogen toksisk effekt ud fra kendskab til strukturelt beslægtede stoffer, og hvis der ikke ses nogen skadelig virkning ved forsøg som beskrevet ovenfor med enkelt dosis svarende til mindst 1000 mg/kg legemsvægt/dag. Grænse-tests er konklusive, undtagen hvis belastning af mennesker indikerer nødvendigheden af anvendelse af en større dosis.

1.5 FREMGANGSMÅDE

1.5.1 **Dosisadministration**

Dyrene får test-kemikaliet syv gange ugentlig hver uge i 90 dage. Ethvert andet regime, fx fem gange ugentlig, skal begrundes. Hvis test-kemikaliet indgives med sonde, skal det gøres i en enkelt dosis, med anvendelse af en mavesonde eller passende intubationsrør. Det maksimale væskevolumen, der kan tilføres ad gangen afhænger af dyrets størrelse. Volumen bør ikke overstige 1 ml/100g kropsvægt, undtaget vandige opløsninger, hvor man kan indgive 2 ml/100g kropsvægt. Undtaget irritative og ætsende stoffer, som normalt vil have øget generende effekt ved større koncentrationer, bør variationen i test-volumen begrænses ved justering af koncentrationen af test-kemikaliet for at sikre et konstant volumen ved alle dosisstørrelser.

Det er vigtigt at sikre, at de kvantiteter af kemikalier, som indtages via føden eller drikkevandet, ikke får indflydelse på den normale ernæring eller vandbalancen. Når test-kemikaliet tilføres med føden, kan man tilføre det enten som en konstant del af føden (ppm) eller en konstant dosisstørrelse i forhold til dyrets vægt; det, man vælger, skal specificeres. Tilføres kemikaliet via sonde, bør det gøres på samme tidspunkt hver dag og dosisstørrelse skal rettes til, så den udgør en konstant størrelse i forhold til dyrets vægt. Hvis et 90-dages forsøg foretages som forløber for et langtids kronisk-toksicitetsforsøg, skal der i begge forsøg gives samme fødesammensætning.

1.5.2 **Observationer**

Observationsperioden skal mindst vare 90 dage. Dyrene i 'satellit'-gruppen, hvor man vil foretage 'follow-up' observationer skal beholdes i en passende periode uden behandling, med henblik på konstatering af fortsat eller ophør af toksisk virkning.

Almindelig kliniks observation bør foretages mindst en gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er), idet man tager i betragtning, hvornår maksimal effekt kan forventes efter indgift. Dyrenes kliniske tilstand bør noteres. Mindst to gange daglig, sædvanligvis morgen og aften, undersøges alle dyrene for tegn på morbiditet eller mortalitet.

I hvert fald før første belastning (for at tage højde for individuelle forskelle) og en gang ugentlig derefter, bør detaljerede kliniske undersøgelse foretages af alle dyrene. Disse undersøgelser skal foretages uden for burene, fortrinsvis på et standard areal og på samme tid i hvert tilfælde. De skal noteres omhyggeligt, fortrinsvis ved anvendelse af et scorings-system, eksplicit defineret af undersøgelseslaboratoriet. Man bør bestræbe sig på, at variationerne i observationsbetingelserne er mindst mulige. Blandt de fund, der skal noteres, (men ikke som de eneste) er ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion og ekskreter og autonom aktivitet (fx tåreflåd, hår-rejsning, pupilstørrelse, usædvanlig respirationsmønster). Forandringer i gang, stilling og respons på håndtering såvel som tilstedeværelse af toniske og kloniske bevægelser, stereotypi (fx overdreven pudsning, repetitive cirkelbevægelser) eller bizar opførsel (fx selvmutilation, baglæns gang) skal også noteres (1).

Oftalmologisk undersøgelse ved hjælp af oftalmoskop eller andet, passende udstyr bør udføres før første gang test-kemikaliet tilføres og ved afslutning af forsøget, fortrinsvis på alle dyrene, men i hvert fald på dem, der fik højeste dosis og på kontrollerne. Hvis der opdages øjenforandringer, skal alle dyrene undersøges.

Hen imod slutningen af belastningsperioden og i hvert fald ikke tidligere end uge 11, foretages undersøgelser af reaktion på sensoriske stimuli af forskellig slags (1) (fx auditoriske, visuelle og proprioceptive stimuli) (2), (3), (4), vurdering af gribe-styrke (5) og af motorisk aktivitet (6). Nærmere detaljer af de procedurer, der kan foretages, findes i de respektive referencer. Andre, alternative fremgangsmåder end de refererede kan imidlertid også anvendes.

Funktionsundersøgelser kan udelades nær forsøgets afslutning, hvis tilsvarende data kan findes i andre tilsvarende forsøg og de daglige kliniske undersøgelser ikke påviste funktionelle mangler.

Undtagelsesvis kan funktionsundersøgelser udelades på grupper, der på anden vis viser tegn på forgiftning i en grad, der vil have afgørende indflydelse på funktionsundersøgelserne.

1.5.2.1 *Kropsvægt og føde/vand-indtagelse*

Alle dyr skal vejes mindst en gang ugentlig. Mængden af fødeindtagelse skal beregnes mindst en gang ugentlig. Hvis test-kemikaliet administreres via drikkevandet, skal vandindtagelsen beregnes mindst en gang ugentlig. Vandforbruget bør også tages i betragtning, når belastningen foretages via føden eller via sonde, da drikke-aktiviteten kan ændres herved.

1.5.2.2 *Hæmatologi og klinisk biokemi*

Stedet, hvor blodprøver tages, bør angives og de bør gemmes på passende vis. Ved forsøgets afslutning tages der prøver lige før eller i forbindelse med aflivningen af dyrene.

Følgende hæmatologiske undersøgelser bør foretages ved forsøgets afslutning og når blodprøver bliver indsamlet undervejs: hæmatokrit, hæmoglobin koncentrationen, erytrocyttal, leukocyttal og differentialtælling, trombocyttal og koagulationstid/koagulationsevnen.

Klinisk biokemiske analyser, som kan vise toksisk virkning på væv, specielt på lever og nyrer, skal udføres på blodprøver taget fra alle dyrene lige før eller i forbindelse med aflivningen (også på moribunde dyr og i forbindelse med dyrs aflivning i førsøgsperioden). På samme måde, som gælder for hæmatologiske prøver, undersøges også blodprøver taget undervejs. Det anbefales at tage fastende blodprøver [1] Analyser på serum og plasma bør inkludere: natrium, kalium, glukose, total kolesterol, carbamid, BUN, kreatinin, total protein og albumin, og mere end to enzymer, der belyser den hepatocellulære effekt (fx alanin aminotransferase, aspartat aminotransferase, alkalisk fosfatase, gamma glutamyl transpeptidase og sorbitol dehydrogenase). Derudover kan inkluderes måling af andre enzymer (fra lever eller andetsteds), galdesure salte, som kan give nyttig information i visse tilfælde.

I den sidste uge af forsøget kan eventuelt følgende urinanalyser udføres, idet timediuresen måles: udseende, volumen, osmolalitet eller vægtfylde, pH, protein, glukose og blod eller blodceller.

Yderligere bør man overveje at måle serummarkører for generel vævsskade. Andre analyser, som bør udføres, hvis test-kemikaliets egenskaber vides eller formodes at afficere beslægtede metaboliske markører, inkluderer calcium, fosfor, fastende triglycerider, specielle hormoner, methæmoglobin og kolinesterase. Disse bør måles i forbindelse med kemikalier af særlige typer eller fra tilfælde til tilfælde.

Almindeligvis må man have en fleksibel indstilling udfra dyrearten og de observerede og/eller forventede virkninger af et givet kemikalium.

Hvis der ikke er tilstrækkeligt kendskab til de biokemiske eller hæmatologiske udgangsværdier, bør man overveje om disse analyser skal foretages før belastningen begynder, men det anbefales almindeligvis ikke (7).

[1] Til en del analyser på serum og plasma, mest udtalt for glukose, foretrækkes fastende blodprøver. Hovedårsagen er den øgede variation, som uundgåeligt følger ikke-faste, og som vil kunne maskere små effekter og derved gøre tolkningen vanskelig. På den anden side vil faste kunne influere på dyrenes almindelige stofskifte, specielt i forsøg, hvor fødeindtagelse står centralt, og derved forstyrre den daglige belastning med test-kemikaliet. Hvis blodprøver tages fastende, skal de tages efter udførelsen af de funktionelle observationer

1.5.2.3 *Makroskopisk obduktion*

Alle dyrene, som indgår i forsøget, skal have udført en fuldstændig, detaljeret makroskopisk obduktion, hvilket inkluderer omhyggelig undersøgelse af alle overflader, alle åbninger, og kraniets, brystkassens og abdomens kaviteter og deres indhold. Lever, nyrer, binyrer, testes, bitestikler, uterus, ovarier, thymus, milt, hjerne og hjerte skal på alle dyr renses for andet vedhængende væv som behørigt, (undtaget er de dyr, der findes moribunde og/eller aflives undervejs i forsøget), og vejes snarest muligt efter dissektionen for at undgå udtørring.

Følgende væv skal præserveres ved hjælp af det mest passende fiksationsmedie både med henblik på vævstypen og den følgende histopatologiske undersøgelse: alle større læsioner, hjernen (repræsentative regioner, inklusive cerebrum, cerebellum, og medulla/pons), rygmarven (fra tre niveauer: cervikal, midt-torakal og lumbal), hypofyse, tyreoidea og paratyreoidea, tymus, øsofagus, spytkirtlerne, mavesækken, tynd-og tyktarm, (inklusive de Peyerske plaques) lever, pankreas, nyrer, binyrer, hjerte, luftrør og lunger (bevaret ved indblæsning med fiksativ og påfølgende neddypning), aorta, gonader, uterus, sekundære kønsorganer, brystkirtlerne fra hundyrene, prostata, urinblære, galdeblære (mus), lymfeknuder (helst en lymfeknude som dækker belastningsvejen og en anden langt derfra for at dække den systemiske virkning), perifer nerve (ischiadicus eller tibialis) helst nær ved musklen, en sektion af knoglemarven, (og/eller frisk knoglemarvsaspirat), hud, øjne (hvis oftalmologisk undersøgelse viste ændringer). Kliniske og andre fund kan foranledige undersøgelse af andet væv. Også særlige organer, der sandsynligvis kan være mål for test-kemikaliets kendte virkninger, bør præserveres.

1.5.2.4 *Histopatologi*

En komplet histopatologisk undersøgelse skal udføres af de præserverede organer og væv på alle dyrene i kontrol og høj-dosis grupperne. Undersøgelserne skal omfatte alle dyrene i de andre grupper, også hvis der observeres ændringer i høj-dosisgruppen, der kan tilskrives belastningen.

Alle større læsioner skal undersøges.

Hvis der anvendes en 'satellit'gruppe, skal der på dem udføres histopatologisk undersøgelse af væv og organer, på hvilke der var vist ændringer i den belastede gruppe.

2. DATA OG RAPPORTERING

2.1 DATA

Alle data skal anføres. Yderligere skal alle data opsummeres i tabeller, der for hver test-gruppe viser antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr fundne døde i løbet af testen eller aflivede af humane grunde og tidspunktet for deres død, det antal dyr, der udviser tegn på forgiftning, en beskrivelse af disse tegn inklusive tidspunktet for deres begyndelse, deres varighed og forgiftningsgraden; det antal dyr, der har læsioner, typen af læsioner og den procentdel af dyrene, der udviser de forskellige typer af læsion.

Hvor det er muligt, skal tallene evalueres ved hjælp af en passende og accepteret statistisk metode. Den statistiske metode og de data, der skal analyseres med den, skal vælges under planlægningen af forsøget.

2.2 TEST-RAPPORT

Test-rapporten skal inkludere følgende informationer:

2.2.1 **Test-kemikalium:**

- fysiske egenskaber, renhedsgrad og fysisk-kemiske egenskaber;
- identifikationsdata;
- indgivelsesmåde, som begrundes, hvis der ikke er tale om drikkevand.

2.2.2 **Dyreart:**

- anvendte art og stamme;
- antal dyr, deres alder og køn;
- kilde, opbevaringsforhold, føde etc.;
- de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

2.2.3 **Forsøgsbetingelser:**

- rationale for valg af dosismængde;
- detaljer vedrørende test-kemikaliets form/opblanding i føden, resulterende koncentration, stabilitet og homogenitet;
- detaljer vedrørende indgift af test-kemikaliet;
- sande dosis (mg/kg kropsvægt/dag) og omregningsfaktor fra test-kemikaliets koncentration i føde/vand (ppm) til sand dosis, hvis muligt;
- detaljer vedrørende kvalitet af vand og føde.

2.2.4 **Resultater:**

- fødeindtagelse og indtagelse af vand, om muligt;
- data vedrørende forgiftning sat overfor køn og dosis, inklusive forgiftningstegnene;
- art, alvor og varighed af det klinisk observerede (om det observerede er reversibelt);
- resultater af oftalmologisk undersøgelse;
- vurdering, hvis muligt, af sanse-aktiviteter, gribe-styrke og motorisk aktivitet;
- hæmatologiske målinger med relevante udgangsværdier;
- klinisk biokemiske målinger med relevante udgangsværdier;
- slutvægt, organernes vægt og organ/kropsvægt-forholdene;
- sektionsfund;
- en detaljeret beskrivelse af de histopatologiske fund;
- data for absorption, hvis de forefindes;
- statistisk behandling af resultaterne, hvor rimeligt.

Diskussion af resultater.

Konklusioner.

3. **REFERENCER**

(1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(2) Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003.

(3) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J.Toxicol. Environ. Health, 9, 691-704.

(4) Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.

(5) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, 233-236.

(6) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599-609.

(7) Weingand K., Brown G., Hall R. et al. (1996). "Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies", Fundam. & Appl. Toxicol., 29, 198-201.