

II

(Muut kuin lainsäätäjärjestyksessä hyväksyttävät säädökset)

ASETUKSET

KOMISSIO ASETUS (EU) N:o 640/2012,

annettu 6 päivänä heinäkuuta 2012,

testimenetelmien vahvistamisesta kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH) annetun Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 1907/2006 nojalla annetun asetuksen (EY) N:o 440/2008 muuttamisesta sen mukauttamiseksi tekniikan kehitykseen

(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

EUROOPAN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan unionin toiminnasta tehdyn sopimuksen,

ottaa huomioon kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH), Euroopan kemikaaliviraston perustamisesta, direktiivin 1999/45/EY muuttamisesta sekä neuvoston asetuksen (ETY) N:o 793/93, komission asetuksen (EY) N:o 1488/94, neuvoston direktiivin 76/769/ETY ja komission direktiivien 91/155/ETY, 93/67/ETY, 93/105/EY ja 2000/21/EY kumoamisesta 18 päivänä joulukuuta 2006 annetun Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 1907/2006 ⁽¹⁾ ja erityisesti sen 13 artiklan 3 kohdan,

sekä katsoo seuraavaa:

tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta 22 päivänä syyskuuta 2010 annetun Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivin 2010/63/EU ⁽²⁾ ja kokeisiin ja muihin tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelua koskevien jäsenvaltioiden lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä 24 päivänä marraskuuta 1986 annetun neuvoston direktiivin 86/609/ETY ⁽³⁾ mukaisesti. Sidosryhmiä on kuultu tästä säädösluonnoksesta.

(3) Sen vuoksi asetusta (EY) N:o 440/2008 olisi muutettava.

(4) Tässä asetuksessa säädetyt toimenpiteet ovat asetuksen (EY) N:o 1907/2006 133 artiklalla perustetun komitean lausunnon mukaiset,

ON HYVÄKSYNYT TÄMÄN ASETUKSEN:

(1) Komission asetuksessa (EY) N:o 440/2008 ⁽²⁾ vahvistetaan asetuksen (EY) N:o 1907/2006 soveltamiseksi käytettävät testimenetelmät, joilla määritellään aineiden fyysikaaliskemialliset ominaisuudet, myrkyllisyys ja myrkyllisyys ympäristölle.

(2) On tarpeen muuttaa asetusta (EY) N:o 440/2008 OECD:n hiljattain hyväksymien uusien ja ajan tasalle saatettujen vaihtoehtoisten testimenetelmien sisällyttämiseksi siihen ensisijaisen tärkeänä pidettynä asiana, jotta koetarkoituksiin käytettävien eläinten määrää voitaisiin vähentää

1 artikla

Muutetaan asetuksen (EY) N:o 440/2008 liite tämän asetuksen liitteen mukaisesti.

2 artikla

Tämä asetus tulee voimaan kolmantena päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu Euroopan unionin virallisessa lehdessä.

⁽¹⁾ EUVL L 396, 30.12.2006, s. 1.

⁽²⁾ EUVL L 142, 31.5.2008, s. 1.

⁽³⁾ EUVL L 276, 20.10.2010, s. 33.

⁽⁴⁾ EYVL L 358, 18.12.1986, s. 1.

Tämä asetus on kaikilta osiltaan velvoittava, ja sitä sovelletaan sellaisenaan kaikissa jäsenvaltioissa.

Tehty Brysselissä 6 päivänä heinäkuuta 2012.

Komission puolesta
Puheenjohtaja
José MANUEL BARROSO

LIITE

Muutetaan asetuksen (EY) N:o 440/2008 liite seuraavasti:

1. Korvataan B.42 luku seuraavasti:

”B.42. IHOHERKISTYS: PAIKALLINEN IMUSOLMUKEMÄÄRITYSMENETELMÄ

JOHDANTO

1. Kemikaalien testausta koskevia OECD:n ohjeita ja niihin perustuvia EU:n testimenetelmiä tarkistetaan säännöllisesti tieteellisen kehityksen, muuttuvien sääntelytarpeiden ja eläinten hyvinvointiin liittyvien kysymysten perusteella. Hiirten ihoherkistykseen määrittämiseksi käytettävä alkuperäinen testimenetelmä, paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä (Local Lymph Node Assay, LLNA; OECD:n testiohje 429; tämän liitteen B.42 luku), on hyväksytty aiemmin (1). LLNA-menetelmän validointia koskevat yksityiskohtaiset tiedot ja siihen liittyvien tehtävien arviointi on julkaistu (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Ajan tasalle saatettu LLNA perustuu kokemusten ja tieteellisten tietojen arviointiin (12). Tämä on toinen menetelmä kemikaalien (aineiden ja seosten) ihoherkistyspotentiaalin arvioimiseksi eläimillä. Toisessa testimenetelmässä (OECD:n testiohje 406; tämän liitteen B.6 luku) käytetään marsutestejä, erityisesti marsuilla tehtävää maksimointitestiä ja Bühlerin testiä (13). LLNA-menetelmä on B.6 menetelmään ja OECD:n testiohjeeseen 406 (13) verrattuna edistyneempi eläinten hyvinvoinnin kannalta. Tässä ajan tasalle saatetussa LLNA-testimenetelmässä esitetään suoritusvaatimuksia (lisäys 1), joiden avulla LLNA-menetelmää toiminnallisesti ja mekaanisesti vastaavien uusien ja/tai mukautettujen testimenetelmien validoinnin tila voidaan arvioida OECD:n ohjeasiakirjan nro 34 (14) periaatteiden mukaisesti.
2. LLNA-menetelmällä tutkitaan ihoherkistykseen induktiovaihetta ja tuotetaan annosvasteen arviointiin sopivia kvantitatiivisia tuloksia. On syytä huomata, että lievää tai keskimääräistä herkistystä aiheuttavia aineita, joita suositellaan positiivisiksi kontrollikemikaaleiksi marsutestimenetelmissä (B.6; OECD:n testiohje 406) (13), voidaan käyttää myös LLNA-menetelmässä (6) (8) (15). Myös koe-eläinten vähäisempään käyttöön perustuva LLNA-menetelmän muunnos (rLLNA-menetelmä), jossa eläimiä käytetään jopa 40 prosenttia vähemmän, kuvataan vaihtoehtona tässä testimenetelmässä (16) (17) (18). rLLNA-menetelmää voidaan käyttää, jos ihoherkistyspotentiaalin ennakoitu negatiivinen löydös on sääntelysistä vahvistettava, edellyttäen että kaikkia muita tässä testimenetelmässä kuvattuja LLNA-meneteltyjen vaatimuksia noudatetaan. Negatiivisen löydöksen oletuksen on perustuttava kaikkiin 4 kohdassa tarkoitettuihin saatavilla oleviin tietoihin. Ennen rLLNA-menetelmän käyttöä on sille esitettävä selvät perustelut ja tieteelliset perusteet. Jos rLLNA-menetelmällä saadaan odotusten vastaisesti positiivinen tai epäselvä tulos, löydöksen tulkitsemiseksi tai selventämiseksi voidaan tarvita täydentäviä testejä. Tätä rLLNA-menetelmää ei saa käyttää ihoherkistystesteissä käytettävien aineiden vaarallisuuden määrittämiseksi siinä tapauksessa, että vaaditaan annosvasteetietoja, kuten aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetussa asetuksessa (EY) N:o 1272/2008 ja Yhdistyneiden kansakuntien (YK) GHS-järjestelmässä (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) määritettyä alaluokitusta.

MÄÄRITELMÄT

3. Sovellettavat määritelmät esitetään lisäyksessä 2.

JOHDANTO JA RAJOITUKSET

4. LLNA on vaihtoehtoinen menetelmä ihoa herkistävien kemikaalien tunnistamiseksi. Tämä ei välttämättä merkitse sitä, että LLNA-menetelmää pitäisi käyttää kaikissa tapauksissa marsutestin asemesta (B.6; OECD:n testiohje 406) (13), vaan pikemminkin sitä, että menetelmä on yhtä hyvä ja sitä voidaan käyttää vaihtoehtona, jossa positiivisia ja negatiivisia tuloksia ei yleensä enää tarvitse varmistaa uudelleen. Testilaboratorion on otettava huomioon kaikki testiaineesta saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen tekemistä. Tällaisia tietoja ovat muun muassa testiaineen tunnistetiedot ja kemiallinen rakenne, sen fysikaaliskemialliset ominaisuudet, muiden testiaineella tehtyjen *in vitro*- tai *in vivo*-myrkyllisyystestien tulokset sekä rakenteellisesti samankaltaisten kemikaalien toksikologiset tiedot. Tietojen perusteella on määritettävä, voidaanko LLNA-menetelmää käyttää kyseisen aineen testaamiseen (ottaen huomioon, että LLNA-menetelmä ei sovellu tiettyjen kemikaalityyppien testaamiseen – katso 1 kohta) ja mitä annosta on käytettävä.
5. LLNA on *in vivo*-menetelmä, joten sitä käytettäessä ei lopeteta koe-eläinten käyttöä kosketusherkistykseen arvioinnissa. Sitä käytettäessä voidaan kuitenkin vähentää tähän tarkoitukseen tarvittavien eläinten määrää. LLNA-menetelmässä käytetty tapa testata kosketusherkistystä eläimillä on myös huomattavasti aikaisempia edistyneempi (vähemmän kipua ja kärsimystä). LLNA-menetelmän perustana on kemikaalien aiheuttamien immunologisten tapahtumien tarkastelu ihoherkistykseen induktiovaiheen aikana. Marsutesteistä (B.6; OECD:n testiohje 406) (13) poiketen LLNA-menetelmässä ei edellytetä tarkoituksellista ihon yliherkkyysreaktioiden tuottamista. LLNA-menetelmä ei myöskään edellytä adjuvantin käyttöä, toisin kuin marsuilla tehtävä maksimointitesti (13). LLNA-menetelmään siis liittyy vähemmän eläinten kipua ja kärsimystä. Vaikka LLNA-menetelmä onkin B.6 menetelmään ja OECD:n testiohjeeseen 406 verrattuna edistyneempi, on syytä huomata, että siihen liittyy tiettyjä rajoituksia, joiden vuoksi voi olla tarpeen käyttää B.6 menetelmää tai OECD:n testiohjetta 406 (13) (väärit negatiiviset löydökset LLNA-menetelmällä joidenkin metallien osalta, väärit positiiviset löydökset joidenkin ihoa ärsyttävien aineiden, esimerkiksi pinta-aktiivisten kemikaalien, osalta (19) (20) tai testiaineen liukoisuus). Määrittystä häiritseviä (21) funktionaalisia ryhmiä sisältävien kemikaaliluokkien tai aineiden yhteydessä voi olla tarpeen käyttää marsutestejä

(B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406) (13). Pääasiassa torjunta-aineformulaatioita sisältävän suppean validointitietokannan perusteella LLNA-menetelmällä saadaan tämäläyppisistä testiaineista (22) marsutestiä todennäköisemmin positiivinen tulos. Formulaatioita testattaessa on kuitenkin tarvittaessa otettava vertailuaineeksi tunnettuja tuloksia antavia aineita sen osoittamiseksi, että LLNA-menetelmä toimii asianmukaisesti (katso 16 kohta). Tällaisia tunnettuja rajoituksia lukuun ottamatta LLNA-menetelmällä olisi pystyttävä testaamaan mitä tahansa ainetta, elleivät kyseisten aineiden ominaisuudet vaikuta LLNA-menetelmän tarkkuuteen.

TESTIN PERIAATE

6. LLNA-menetelmän peruseriaate on, että ihoa herkistävät aineet aiheuttavat lymfosyyttien proliferaatiota imusolmukkeissa, jotka dreneeraavat alueen, jonne testiaine on annosteltu. Tämä proliferaatio on suhteessa allergeenin annokseen ja potenssiin ja tarjoaa yksinkertaisen keinon ihoherkistuksen mittaamiseksi kvantitatiivisella tavalla. Proliferaatio mitataan vertaamalla kussakin testiryhmässä tapahtuvaa keskimääräistä proliferaatiota kantaja-aineella käsitellyssä kontrolliryhmässä tapahtuvaan keskimääräiseen proliferaatioon. Kunkin käsitellyn ryhmän keskimääräisen proliferaation ja sitä vastaavan kantaja-aineella käsitellyn ryhmän keskimääräisen proliferaation suhde (stimulaatioindeksi, SI) määritetään, ja sen on oltava vähintään 3, ennen kuin testiaine voidaan arvioida mahdollisesti ihoherkistystä aiheuttavaksi. Tässä kuvatut menetelmät perustuvat korvalehden dreneeraavien imusolmukkeiden solujen proliferaation mittaamiseen radioaktiivisen *in vivo* -merkkiaineen avulla. Solujen proliferaation arvioimiseksi voidaan kuitenkin käyttää myös muita päätöspisteitä edellyttäen, että suoritusvaatimukset täytetään (lisäys 1).

MÄÄRITYSMENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

7. Paras eläinlaji tähän testiin on hiiri. Testissä käytetään nuoria täysikasvuisia CBA/Ca- tai CBA/J-kannan naarashiiriä, jotka eivät ole synnyttäneet eivätkä ole raskaana. Testin alussa eläinten on oltava 8–12 viikon ikäisiä, ja eläinten painorojen on oltava vähäisiä eli enintään 20 prosenttia keskipainosta. Muita kantoja tai uroseläimiä voidaan käyttää, jos tietoja tuotetaan riittävästi sen osoittamiseksi, että LLNA-vasteessa ei esiinny merkitseviä koe-eläinkantaan tai sukupuoleen liittyviä eroja.

Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta

8. Hiiret on pidettävä samoissa häkeissä (23), ellei hiirien pitämiselle erillisissä häkeissä esitetä riittäviä tieteellisiä perusteluja. Koe-eläintilan lämpötilan on oltava 22 ± 3 celsiusastetta. Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70 prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, on kuitenkin pyrittävä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa on käytettävä keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa.

Eläinten valmistelu

9. Eläimet valitaan satunnaistetusti, merkitään niin, että yksilöt voidaan erottaa toisistaan (ei kuitenkaan korvamärkeillä), ja pidetään häkeissä vähintään viiden päivän ajan ennen testiaineen annostelun aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-olosuhteisiin. Ennen käsittelyn alkua kaikki eläimet on tutkittava sen varmistamiseksi, ettei niillä ole havaittavia ihovaurioita.

Annosteluliusten valmistelu

10. Kiinteät kemikaalit on liuotettava tai sekoitettava liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja tarvittaessa laimennettava ennen niiden annostelua hiiren korvaan. Nestemäiset kemikaalit voidaan annostella laimentamattomana tai ennen annostelua laimennettuina. Vaikealiukoisia kemikaaleja, kuten sellaisia, joita käytetään yleisesti lääkinnällisissä laitteissa, olisi uutettava erityisen voimakkaasti asianmukaisessa liuottimessa, jotta saataisiin testausta varten esiin kaikki uutuvat ainesosat ennen annostelua hiirten korviin. Testiaineet on valmistettava päivittäin, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiileittutkimuksilla.

Testin luotettavuuden tarkistus

11. Määritysmenetelmän toimivuus osoitetaan positiivisten kontrollikemikaalien avulla. Niillä on testissä saatava aikaan riittävä ja toistettavissa oleva herkistyminen, ja vasteen voimakkuuden on oltava aineelle tyypillinen. Positiivisen kontrollikemikaalin käyttöä samanaikaisesti suositellaan, koska sillä osoitetaan, että laboratoriolle on riittävä pätevyys kunkin määritysmenetelmän toteuttamiseksi, ja sen avulla voidaan arvioida laboratoriorien sisäistä ja laboratoriorien välistä uussittavuutta ja vertailtavuutta. Myös tietyt sääntelyviranomaiset vaativat positiivisen kontrollikemikaalin käyttöä jokaisessa määrityksessä, ja käyttäjiä kehoitetaan ottamaan yhteyttä asiasta vastaaviin viranomaisiin ennen LLNA-menetelmän toteuttamista. Tämän takia suositellaan, että positiivista kontrollikemikaalia käytetään säännönmukaisesti kaikissa määrityksissä, jotta positiivisen kontrollikemikaalin satunnaisesta käytöstä mahdollisesti johtuvien vaatimusten täyttämiseksi ei tarvitsisi tehdä uusia eläinkokeita (katso 9 kohta). Positiivisen

kontrollikemikaalin on tuotettava positiivinen LLNA-vaste altistustasolla, jonka odotetaan antavan stimulaatioindeksin (SI), joka on suurempi kuin 3, negatiiviseen kontrolliryhmään verrattuna. Positiivisen kontrollikemikaalin annostaso on valittava siten, että se ei aiheuta liian voimakasta ihoärsytystä tai koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja että induktio on toistettavissa mutta ei liian suuri (esimerkiksi $SI > 20$ on liian suuri). Suositeltavia positiivisia kontrollikemikaaleja ovat 25-prosenttinen heksyylikanelialdehydi (CAS-numero 101-86-0) asetonin ja oliiviöljyn seoksessa (4:1 v/v) ja 5-prosenttinen merkaptobentsotiatoli (CAS-numero 149-30-4) N,N-dimetyyliformamidissa (katso lisäyksen 1 taulukko 1). Joissakin olosuhteissa voidaan riittävän perusteella käyttää muita positiivisia kontrollikemikaaleja, jotka täyttävät edellä mainitut kriteerit.

12. Vaikka positiivisen kontrolliryhmän käyttöä suositellaan aina, joissakin tapauksissa positiivisen kontrollikemikaalin testaus vain ajoittain (enintään kuuden kuukauden välein) voi riittää LLNA-menetelmää säännöllisesti käyttävissä laboratorioissa (eli sellaisissa, jotka tekevät LLNA-määrittystä vähintään kerran kuukaudessa) ja joilla on aiempia positiivisen kontrollikemikaalin määritystietoja, jotka osoittavat laboratorion valmiuden saada aikaan uusittavissa olevia ja täsmällisiä tuloksia positiivisilla kontrollikemikaaleilla. Riittävä LLNA-menetelmää koskeva pätevyys voidaan osoittaa tuottamalla positiivisella kontrollikemikaalilla toistuvasti samantasoisia positiivisia tuloksia vähintään kymmenessä riippumattomassa testissä kohtuullisen ajan kuluessa (alle yhden vuoden aikana).
13. Samaan aikaan tehtyä positiivista kontrollikemikaalia on käytettävä aina, kun LLNA-menetelmää muutetaan (esimerkiksi kun koulutettu henkilökunta vaihtuu, testimenetelmän materiaalit ja/tai reagenssit vaihtuvat, testimenetelmässä käytettävät laitteet vaihtuvat tai koe-eläinten alkuperä vaihtuu), ja tällaiset muutokset on kirjattava laboratorioraportteihin. Muutosten vaikutusta aiempien määritystietojen asianmukaisuuteen on tarkasteltava päätettäessä, onko uusien määritystietojen kerääminen tarpeen positiivisen kontrollikemikaalin tulosten yhdenmukaisuuden osoittamiseksi.
14. Tutkijoiden on otettava huomioon, että jos positiivista kontrollikemikaalia ei määritetä joka kerralla vaan vain silloin tällöin, saattaa negatiivisten tutkimustulosten asianmukaisuus ja hyväksyttävyys vaarantua, kun ajoittain tehtyjen positiivisen kontrollikemikaalin määritysten välillä ei tehdä positiivisen kontrollikemikaalin määritystä samanaikaisesti. Jos esimerkiksi ajoittaisesta positiivisen kontrollikemikaalin määrittämisestä saadaan väärä negatiivinen tulos, positiivisen kontrollikemikaalin viimeisen hyväksytyyn ajoittaisen määrittämis- ja positiivisen kontrollikemikaalin hylätyn ajoittaisen määrittämis- tuloksen välisenä aikana saadut testiaineen negatiiviset tulokset voivat olla kyseenalaisia. Näiden tulosten seurauksia on tarkasteltava huolellisesti päätettäessä positiivisten kontrollikemikaalien käyttämisestä testiaineen rinnalla tai vain ajoittain. Lisäksi olisi harkittava, että testiaineen rinnalla käytettävää positiivista kontrolliryhmää varten käytettäisiin vähemmän eläimiä, jos se on tieteellisesti perusteltua ja jos laboratorio osoittaa laboratoriokohtaisten aiempien tietojen perusteella, että käytettävien hiirten määrää voidaan vähentää (12).
15. Vaikka positiiviset kontrollikemikaalit on testattava kantaja-aineessa, jonka tiedetään antavan aina samanlaisen vasteen (esimerkiksi aseton:oliiviöljy, 4:1 v/v), joissakin tapauksissa testaus saattaa sääntelysysteistä olla tarpeen myös muussa kuin standardikantaja-aineessa (kliinisesti/kemiallisesti relevantissa aineessa) (24). Jos samanaikaisesti määritettävää positiivista kontrollikemikaalia testataan eri kantaja-aineessa kuin testiainetta, on sitä varten käytettävä erillistä kantaja-aineella käsiteltyä positiivista kontrollia.
 - rakenteellinen ja funktionaalinen vastaavuus testattavana olevaan testiaineluokkaan verrattuna
 - tunnetut fyysiset/kemialliset ominaisuudet
 - sopivuutta tukevia LLNA-menetelmästä saatuja tietoja
 - sopivuutta tukevia muista eläinmalleista ja/tai ihmisistä saatuja tietoja.
16. Arvioitaessa tiettyyn kemikaaliluokkaan kuuluvia tai tietyn vastetason aikaansaavia testiaineita voidaan myös käyttää vertailuaineita sen osoittamiseksi, että testimenetelmällä voidaan asianmukaisesti havaita tämäntyyppisten testiaineiden ihoherkistyspotentiaali. Vertailuaineilla olisi oltava seuraavat ominaisuudet:
 - rakenteellinen ja funktionaalinen vastaavuus testattavana olevaan testiaineluokkaan verrattuna
 - tunnetut fyysiset/kemialliset ominaisuudet
 - sopivuutta tukevia LLNA-menetelmästä saatuja tietoja
 - sopivuutta tukevia muista eläinmalleista ja/tai ihmisistä saatuja tietoja.

TESTIMENETTELY

Koe-eläinten määrä ja annostasot

17. Kussakin annostasoryhmässä on oltava vähintään neljä eläintä, ja testiaineesta on käytettävä vähintään kolmea konsentraatiota; lisäksi käytetään aina negatiivista kontrolliryhmää, joka käsitellään vain testiaineen kantaja-aineella, sekä positiivista kontrolliryhmää (jota käytetään aina tai jota on käytetty hiljattain, laboratorion toimintatavan mukaisesti, ottaen huomioon 11–14 kohdat). Positiivisesta kontrolliryhmästä on tarvittaessa testattava useita annoksia, etenkin jos positiivista kontrollikemikaalia testataan epäsäännöllisesti. Kontrolliryhmän eläimiä on kohdeltava samalla tavoin kuin testiryhmän eläimiä, paitsi että niitä ei käsitellä testiaineella.

18. Annostason ja kantaja-aineen valinnan on perustuttava lähteissä (3) ja (5) esitettyihin suosituksiin. Yleensä valitaan sopivasta konsentraatiosarjasta, esimerkiksi sarjasta 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % jne. peräkkäisiä konsentraatioita. Käytettävälle konsentraatiosarjalle on esitettävä asianmukaiset tieteelliset perustelut. Kaikki käytettävissä olevat toksikologiset tiedot (esimerkiksi akuutti toksisuus ja ihoärsytys) ja rakenteelliset ja fysikaaliskemialliset tiedot kyseisestä testiaineesta (ja/tai rakenteellisesti vastaavista aineista) on tarvittaessa otettava huomioon kolmen peräkkäisen konsentraation valinnassa siten, että suurin konsentraatio edustaa maksimialtistusta, mutta kuitenkin niin, että vältetään koko elimistöön kohdistuva toksisuus ja/tai liian voimakas paikallinen ihoärsytys (3) (25). Jos tällaisia tietoja ei ole käytettävissä, voi olla tarpeen tehdä alustava kartoitustesti (katso 21–24 kohta).
19. Kantaja-aine ei saa vaikuttaa testituloksiin tai vääristää niitä, ja se on valittava siten, että testiaineen annosteluun sopivan liuoksen/suspension aikaan saannissa varmistetaan suurin mahdollinen liukoisuus ja konsentraatio. Suositeltavia kantaja-aineita ovat asetoni:oliiviöljy (4:1 v/v), *N,N*-dimetyyliformamidi, metyylietyyliketoni, propyleeniglykoli ja dimetyylisulfoksidi (19), mutta muitakin kantaja-aineita voidaan käyttää riittävän tieteellisin perustein. Joissakin tilanteissa voi olla tarpeen käyttää lisäkontrolliaineena kliinisesti perusteltua liuotinta tai sitä kaupallista valmistetta, jona testiainetta markkinoidaan. Erityisesti on varmistettava, että hydrofiliset testiaineet sisällytetään sellaiseen kantaja-ainejärjestelmään, joka vettää ihon eikä valu heti pois, lisäämällä asianmukaisia liukenemistä edistäviä aineita (esimerkiksi 1-prosenttinen Pluronic® L92). On siis syytä välttää kantaja-aineina pelkkiä vesiliukoksia.
20. Yksittäisten hiirten imusolmukkeita prosessoimalla voidaan arvioida eläintenvälistä vaihtelua ja vertailla tilastollisesti testiaineella ja kantaja-aineella käsiteltyjen ryhmien tuloksia (katso 35 kohta). Myös positiivisen kontrolliryhmän hiirten määrän vähentämisen arviointi on mahdollista, kun tietoja kerätään yksittäisistä eläimistä (12). Tietty sääntelyviranomaiset vaativat, että tietoja on kerättävä yksittäisistä eläimistä. Jotkut sääntelyviranomaiset kuitenkin hyväksyvät useista eläimistä yhdistettyjä tietoja, ja tällaisissa tilanteissa käyttäjät voivat kerätä tietoja joko yksittäisistä eläimistä tai eläinryhmistä.

Varsinaista testiä edeltävä kartoitustesti

21. Jos suurimman testattavan annoksen määrittämiseksi ei ole saatavilla tietoja (katso 18 kohta), on kartoitettava esitestillä, mikä olisi LLNA-menetelmän testeissä käytettävä asianmukainen annostaso. Kartoitustesti helpottaa enimmäisannoksen tason valinnassa varsinaista LLNA-tutkimusta varten, kun tietoja koko elimistöön kohdistuvan toksisuuden (katso 24 kohta) ja/tai liian voimakkaan paikallisen ihoärsytyksen (katso 23 kohta) aiheuttavasta konsentraatiosta ei ole saatavilla. Testattavan enimmäisannoksen tason on vastattava sataa prosenttia nestemäisen testiaineen osalta tai suurinta mahdollista konsentraatiota kiinteiden tai suspendoitujen aineiden osalta.
22. Kartoitustesti suoritetaan varsinaista LLNA-tutkimusta vastaavissa olosuhteissa, kuitenkin niin, että imusolmukkeiden proliferaatiota ei arvioida ja kussakin annosryhmässä voidaan käyttää vähemmän eläimiä. Kussakin annosryhmässä olisi hyvä käyttää yhtä tai kahta eläintä. Kaikkia hiiriä tarkkaillaan päivittäin koko elimistöön kohdistuvan toksisuuden tai applikaatiokohdassa esiintyvän paikallisen ärsytyksen kliinisten merkkien havaitsemiseksi. Eläinten paino kirjataan ennen testaamista ja ennen eläinten lopettamista (päivä 6). Kunkin hiiren molemmista korvista tutkitaan eryteeman merkit, ja ne pisteytetään taulukon 1 mukaisesti (25). Korvan paksuus mitataan paksuusmittarilla (esimerkiksi digitaalisella mikrometrillä tai Peacock Dial -paksuusmittarilla) päivänä 1 (ennen annosta), päivänä 3 (noin 48 tunnin kuluttua ensimmäisestä annoksesta) ja päivänä 6. Päivänä 6 korvan paksuus voidaan myös määrittää mittaamalla korvan lävistämiseen tarvittava massa sen jälkeen, kun eläimet on lopetettu humanisti. Jos eryteema on erittäin voimakas ja/tai korvan paksuus on kasvanut vähintään 25 prosenttia minä tahansa mittauspäivänä, paikallinen ihoärsytys pisteytetään arvolla ≥ 3 (26) (27). Suurin varsinaiseen LLNA-tutkimukseen valittava annos on testiä edeltävän konsentraatiosarjan (katso 18 kohta) suurin annos, joka ei enää aiheuta koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja/tai liian voimakasta paikallista ihoärsytystä.

Taulukko 1

Eryteemapisteytys

Havainto	Pisteet
Ei eryteemaa	0
Hyvin lievä eryteema (tuskin havaittava)	1
Selkeästi erottuva eryteema	2
Keskivakava–vakava eryteema	3
Vakava eryteema (voimakas punoitus)–karsta, joka estää eryteeman pisteytyksen	4

23. Käsiteltyjen hiirten korvien paksuuden tilastollisesti merkittävää yli 25 prosentin kasvua (26) (27) kontrollihiiriin verrattuna on käytetty myös LLNA-menetelmän ärsyttävien aineiden määrittämisessä (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Vaikka tilastollisesti merkittävää paksuuden kasvua voi esiintyä silloinkin, kun korvan paksuus on alle 25 prosenttia, sen ei katsota liittyvän erityisesti erittäin voimakkaaseen ärsytykseen (30) (32) (33) (34).
24. Seuraavat kliiniset havainnot voivat yhdenmukaisesti arvioinnin osana olla osoituksena koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta (35) (36) ja voivat näin ollen olla osoituksena suurimmasta annostasosta, jota varsinaisessa LLNA-menetelmässä voidaan käyttää: muutokset hermoston toiminnassa (esimerkiksi karvojen jäykistyminen, ataksia, vapina ja kouristukset); muutokset käyttäytymisessä (esimerkiksi aggressiivisuus, muutokset turkin hoidossa, aktiivisuustason huomattava muuttuminen); muutokset hengityksessä (hengityksen säännöllisyyden ja syvyyden muutokset, kuten hengenahdistus, hengen haukkominen ja rahina) sekä muutokset ravinnon ja veden kulutuksessa. Arvioinnissa on huomioitava myös letargian ja/tai passiivisuuden merkit, vähäistä tai hetkittäistä kipua suuremman kivun ja kärsimyksen mahdolliset kliiniset merkit tai eläimen painon yli viiden prosentin laskeminen päivästä 1 päivään 6 sekä kuolleisuus. Kuolevat eläimet, selvästi kärsivät eläimet tai eläimet, jotka osoittavat selviä merkkejä voimakkaasta ja jatkuvasta kärsimyksestä, on lopetettava humanisti (37).

Varsinaisen tutkimuksen aikataulu

25. Määrittäksen aikataulu on seuraava:

- *Päivä 1:* Määritetään ja kirjataan kunkin koe-eläimen paino ja tehdään ja kirjataan mahdolliset kliiniset havainnot. Kunkin korvan takaosaan applikoidaan 25 µl testiainetta, kantaja-ainetta tai positiivisen kontrollikemikaalin (jota käytetään aina tai jota on käytetty hiljattain, laboratorion toimintatavan mukaisesti, ottaen huomioon 11–15 kohdat) sopivaa laimennosta.
- *Päivät 2 ja 3:* Toistetaan päivänä 1 toteutettu applikointimenettely.
- *Päivät 4 ja 5:* Ei käsitelyä.
- *Päivä 6:* Kirjataan kunkin eläimen paino. Ruiskutetaan 250 µl steriiliä fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (PBS), joka sisältää 20 µCi ($7,4 \times 10^5$ Bq) tritiumilla merkittyä (^3H)-metyylitymidiniä, kaikkiin testi- ja kontrolliryhmän hiiriin häntävaltimon kautta. Vaihtoehtoisesti ruiskutetaan 250 µl steriiliä PBS:ää, joka sisältää 2 µCi ($7,4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I -jodideoksiuridiiniä ja 10^{-5} -molaarista fluorideoksiuridiiniä, kaikkiin hiiriin häntävaltimon kautta. Viiden tunnin (5 h) kuluttua eläimet lopetetaan humanisti. Kummastakin korvasta leikataan irti dreneeraavat korvalehden imusolmukkeet, ja kunkin eläimen imusolmukkeet upotetaan PBS:ään (vain yhden yksilön näytteet); vaihtoehtoisesti kummankin korvan imusolmukkeet voidaan leikata ja koko koeryhmän imusolmukkeet voidaan upottaa PBS:ään (käsiteltyryhmän näytteet yhdistetään). Imusolmukkeiden tunnistukseen ja leikkaamiseen liittyvät yksityiskohdat ja kaaviot esitetään lähteessä (12). Paikallista ihovastetta voidaan seurata varsinaisessa tutkimuksessa tarkemmin niin, että tutkimussuunnitelmaan sisällytetään täydentäviä parametreja, kuten korvan eryteeman pisteytys tai korvan paksuutta koskevat mittaustulokset (saadaan joko paksuusmittarilla tai ruumiinavauksen yhteydessä tehtävillä korvan lävistämiseen tarvittavan massan mittauksilla).

Solususpensioiden valmistus

26. Yksittäisten eläinten imusolmukeparien soluista tai testiryhmien yhdistetyistä imusolmukesoluista valmistetaan suspensio, jossa kaikki solut ovat irrallaan muista (yksisolususpensio), mekaanisesti hajottamalla solukertymät painamalla ne varovaisesti ruostumattoman terässeulan läpi (silmäkoko 200 µm) tai käyttämällä muuta yksisolususpension valmistamiseksi hyväksyttyä tekniikkaa. Imusolmukesolut pestään kahdesti runsaalla PBS:llä, ja DNA saostetaan 5-prosenttisessä trikloorietikkahapossa 4 °C:n lämpötilassa 18 tunnin ajan (3). Pelletit voidaan joko suspendoida uudelleen 1 ml:aan trikloorietikkahappoa ja siirtää tuikeputkiin, joissa on 10 ml tuikenestettä ^3H -laskentaa varten, tai siirtää suoraan gammalaskentaputkiin ^{125}I -laskentaa varten.

Solujen proliferaation (inkorporoituneen radioaktiivisuuden) määrittäminen

27. ^3H -metyylitymidiniin inkorporoituminen mitataan β -tuikelaskennalla hajoamisina minuutissa (DPM). ^{125}I -jodideoksiuridiiniin inkorporoituminen mitataan ^{125}I -laskennalla ja ilmoitetaan niin ikään DPM-arvona. Inkorporoituminen ilmoitetaan DPM:nä joko eläintä kohti tai testiryhmää kohti.

Vähemmän koe-eläimiä käyttävä LLNA-menetelmä

28. Vaihtoehtoisista, vähemmän koe-eläimiä käyttävää rLLNA-menetelmää (16) (17) (18) voidaan soveltaa tietyissä tapauksissa, joissa ihoherkistyspotentiaalin negatiivinen oletus on sääntelysistä vahvistettava, edellyttäen että kaikkia muita tässä testimenetelmässä kuvattuja LLNA-menettelyn vaatimuksia noudatetaan. rLLNA-menettelyn käyttö on perusteltava selvästi ja tieteellisesti ennen menetelmän käyttöä. Jos tulos on positiivinen tai epäselvä, löydöksen tulkitsemiseksi tai selventämiseksi voidaan tarvita täydentäviä testejä.

29. LLNA- ja rLLNA-testimenetelmien ainoana erona on erilainen annosryhmien määrä, minkä vuoksi rLLNA-menetelmä ei anna tietoja annosvasteesta. Näin ollen rLLNA-menetelyä ei pidä käyttää, jos annosvastetta koskevia tietoja tarvitaan. Kuten useisiin annoksiin perustuvassa LLNA-menetelyssä, myös rLLNA-menetelyssä arvioitavan testiaineen konsentraationa on käytettävä suurinta konsentraatiota, joka ei vielä aiheuta hiiressä koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja/tai liian voimakasta ihoärsytystä (katso 18 kohta).

HAVAINNOT

Kliiniset havainnot

30. Kustakin hiirestä on päivittäin havainnoitava huolellisesti mahdolliset kliiniset merkit joko annostelualan paikallisesta ärsytyksestä tai koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta. Kaikki havainnot kirjataan järjestelmällisesti erikseen kustakin hiirestä. Seurantasuunnitelmissa on esitettävä myös perusteet, joiden avulla voidaan nopeasti tunnistaa hiiret, joissa havaitaan merkkejä koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta, erittäin voimakkaasta paikallisesta ihoärsytyksestä tai ihosyövyttävyydestä, jotta ne voitaisiin lopettaa (37).

Ruumiinpainot

31. Kuten 25 kohdassa todetaan, kukin eläin on punnittava erikseen testin alussa ja aikataulun mukaisesti humanin lopettamisen yhteydessä.

TULOSTEN LASKEMINEN

32. Kunkin käsittelyryhmän tulokset ilmoitetaan stimulaatioindeksinä (SI). Yksilönäytteistä SI-arvo saadaan jakamalla kunkin testiaineryhmän ja positiivisen kontrolliryhmän hiirikohtaisista DPM-arvoista laskettu keskiarvo liuotin/kantaja-aineryhmän vastaavalla tuloksella. Kantaja-aineella käsiteltyjen kontrolliryhmien SI:n keskiarvo on 1. Ryhmänäytteistä SI-arvo saadaan jakamalla kunkin testiryhmän yhdistetty radioaktiivinen inkorporoituminen kantaja-aineryhmän yhdistetyllä inkorporoitumisella, jolloin saadaan SI:n keskiarvo.
33. Tulos katsotaan positiiviseksi, kun $SI \geq 3$. Päätettäessä, katsotaanko rajatulos positiiviseksi, voidaan myös käyttää annosvasteen voimakkuutta, tilastollista merkitsevyyttä sekä liuotimen/kantaja-aineen ja positiivisen kontrollikeimikaalin vasteiden yhdenmukaisuutta (4) (5) (6).
34. Jos saatuja tuloksia pitää selvittää, huomioon on otettava testiaineen erilaiset ominaisuudet, mukaan luettuina mahdolliset rakenteelliset yhtäläisyydet tunnettuihin ihoherkistystä aiheuttaviin aineisiin, sen hiirelle mahdollisesti aiheuttama erittäin voimakas paikallinen ihoärsytys ja havaitun annosvasteen luonne. Näitä ja muita huomion-arvoisia seikkoja käsitellään yksityiskohtaisesti lähteessä (7).
35. Kun radioaktiivisuuden mittaustuloksia kerätään erikseen kustakin hiirestä, voidaan niiden perusteella analysoida tilastollisesti mahdollista annosvastetta ja sen tasoa. Tilastollisessa arvioinnissa voidaan myös arvioida annosvasteen voimakkuutta ja tehdä asianmukaisesti mukautettuja vertailuja testiryhmillä (esimerkiksi pareittain annoksen saaneen ryhmän vertailu kantaja-ainekontrolliryhmään, kun kontrolli on tehnyt samanaikaisesti). Tilastoanalyysissä voidaan käyttää esimerkiksi lineaarista regressiota tai Williamin testiä, joilla arvioidaan annos-vastesuuntauksia, sekä Dunnettin testiä, jolla vertaillaan pareja. Tutkijan on otettava asianmukaisen tilastollisen analyysimenetelmän valinnassa huomioon varianssien mahdolliset erot ja muut vastaavat ongelmat, jotka saattavat edellyttää määrittäytulosten muuntamista tai non-parametrinen tilastollista analyysia. Joka tapauksessa tutkija voi joutua tekemään SI-laskelmia ja tilastoanalyysia siten, että mukana on tai ei ole tiettyjä määrittäyskohtia koskevia tietoja (ns. käyrän ulkopuolella olevat tulokset).

MITTAUSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

Mittaustulokset

36. Mittaustulokset on esitettävä taulukkona. Yksilönäytteiden osalta esitetään eläinkohtaiset DPM-arvot, ryhmän eläinkohtaisen DPM-arvon keskiarvo, siihen liittyvä virhe (esimerkiksi keskihajonta tai keskiarvon keskivirhe) sekä kunkin annosryhmän keskimääräinen SI vastaavaan kantaja-ainekontrolliryhmään verrattuna. Ryhmänäytteiden osalta esitetään keskimääräinen DPM / DPM:n mediaani sekä kunkin annosryhmän keskimääräinen SI samanaikaisesti käsiteltyyn kantaja-ainekontrolliryhmään verrattuna.

Testiraportti

37. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testi- ja kontrolliaineet

— tunnistetiedot (esimerkiksi CAS- ja EC-numerot, jos tiedossa; alkuperä, puhtaus, tunnetut epäpuhtaudet, eränumero),

— fysikaalinen olomuoto ja fysikaaliskemialliset ominaisuudet (esimerkiksi haihtuvuus, stabiilisuus, liukoisuus),

- jos kyseessä on seos, sen koostumus ja ainesosien suhteelliset osuudet.

Liuotin/kantaja-aine

- tunnistetiedot (puhtaus, tarvittaessa konsentraatio, käytetty tilavuus),
- perustelut kantaja-aineen valinnalle.

Koe-eläimet

- CBA-hiirten alkuperä,
- eläinten mikrobiologinen tila, jos se on tiedossa,
- eläinten määrä ja ikä,
- eläinten alkuperä, koe-eläintilat, ruokavalio ja niin edelleen.

Testiolosuhteet

- tiedot testiaineen valmistelusta ja annostelusta,
- perustelut annostasojen valinnalle (mukaan luettuina kartoitustestin tulokset, jos sellainen on tehty),
- käytetyt kantaja- ja testiaineiden konsentraatiot ja annostellun testiaineen kokonaismäärä,
- tiedot ravinnon ja veden laadusta (mukaan luettuina ruokavalion tyyppi/alkuperä, veden alkuperä),
- tiedot käsittely- ja näytteenottoaikatauluista,
- toksisuuden mittaamenetelmät,
- tutkimusten positiivisuuden tai negatiivisuuden arviointiperusteet,
- tiedot menettelystä poikkeamisesta ja selvitys siitä, miten poikkeaminen vaikuttaa tutkimussuunnitelmaan ja tuloksiin.

Luotettavuuden tarkistus

- yhteenveto viimeisimmän luotettavuustarkistuksen tuloksista, mukaan luettuina tiedot käytetystä testiaineesta, konsentraatiosta ja kantaja-aineesta,
- testauslaboratorion samanaikaisesti tehtyjen ja/tai aiemmin tehtyjen positiivisten ja samanaikaisesti tehtyjen negatiivisten kontrollien tulokset,
- jos määrittämisessä ei ollut samanaikaisesti tehtyä positiivista kontrollia, on annettava viimeisimmän positiivisen kontrollin päivämäärä ja laboratorioraportti sekä yksityiskohtainen selvitys laboratorion aiemmista positiivisista kontrollitiedoista, joiden perusteella positiivista kontrollia ei tehty.

Tulokset

- kunkin hiiren paino annostelun alussa ja aikataulun mukaisen lopettamisen yhteydessä sekä kunkin annosryhmän keskimääräinen virhetermi ja siihen liittyvä virhetermi (esimerkiksi keskihajonta tai keskiarvon keski-
virhe),
- toksisuuden ilmeneminen ajan funktiona ja toksisuuden merkit, mukaan luettuna annostelualan ihoärsytys, jos sellaista esiintyy, erikseen kullekin eläinryhmälle,
- taulukko kunkin hiiren (yksilönäytteet) tai kunkin käsittelyryhmän (ryhmänäytteet) keskimääräisistä DPM- ja SI-arvoista / DPM:n ja SI:n mediaaneista,

- kunkin käsittelyryhmän hiirikohtaisen DPM-arvon keskimääräinen virhetermi ja siihen liittyvä virhetermi (esimerkiksi keskihajonta ja keskiarvon keskivirhe) sekä käyrän ulkopuolella olevien vasteiden analyysin tulokset kullekin käsittelyryhmälle käytettäessä yksittäisiä eläimiä,
- testiaineella ja kontrolliaineella käsitellyille ryhmille yksilönäytteiden yhteydessä laskettu SI ja asianmukaisesti määritetty vaihteluväli, jossa otetaan huomioon eläinten välinen vaihtelu,
- annos-vastesuhde,
- tarvittaessa tilastolliset analyysit.

Tulosten pohdinta

- tulosten lyhyt kommentointi, annos-vasteanalyysi ja tarvittaessa tilastollinen analyysi sekä johtopäätös siitä, onko testiainetta pidettävä ihoherkistystä aiheuttavana.

LÄHDELUETTELO

- (1) OECD (2002). Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429. Pariisi. Saatavilla osoitteessa <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- (2) Kimber, I. ja Basketter, D. A. (1992). The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary. *Food Chem. Toxicol.* 30, s. 165–169.
- (3) Kimber, I., Dearman, R. J., Scholes, E. W. ja Basketter, D. A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.* 93, s. 13–31.
- (4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Basketter, D. A., Lea, L., House, R. V., Ladies, G. S., Loveless, S. E. ja Hastings, K. L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health* 53, s. 563–79.
- (5) Chamberlain, M. ja Basketter, D. A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol.* 34, s. 999–1002.
- (6) Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Kimber, I. ja Loveless, S. E. (1996). The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.* 34, s. 985–997.
- (7) Basketter, D. A., Gerberick, G. F. ja Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.* 36, s. 327–33.
- (8) Van Och, F. M. M., Slob, W., De Jong, W. H., Vandebriel, R. J. ja Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.* 146, s. 49–59.
- (9) Dean, J. H., Twerdok, L. E., Tice, R. R., Sailstad, D. M., Hattan, D. G. ja Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, s. 258–273.
- (10) Haneke, K. E., Tice, R. R., Carson, B. L., Margolin, B. H. ja Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, s. 274–286.
- (11) Sailstad, D. M., Hattan, D., Hill, R. N. ja Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, s. 249–257.
- (12) ICCVAM (2009). Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH-julkaisunumero 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStd.pdf
- (13) OECD (1992). *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

- (14) OECD (2005). *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- (15) Dearman, R. J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D. A. ja Kimber, I. (1998). Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde. *J. Appl. Toxicol.* 18, s. 281–284.
- (16) Kimber, I., Dearman, R. J., Betts, C. J., Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Kern, P. S., Patlewicz, G. Y. ja Basketter, D. A. (2006). The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis* 54, s. 181–185.
- (17) ESAC (2007). Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA). Euroopan komission pääosasto – yhteinen tutkimuskeskus, kuluttajien terveyden ja kuluttajansuojan laitos, Euroopan vaihtoehtoisten menetelmien validointikeskus, huhtikuu 2007. Saatavilla osoitteessa http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf
- (18) ICCVAM (2009). The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products. NIH-julkaisunumero 09-6439. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa <http://iccvam.niehs.nih.gov/>
- (19) ICCVAM (1999). The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH-julkaisunumero 99-4494. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf
- (20) Kreiling, R., Hollnagel, H. M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M. S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. ja Wendel, A. (2008). Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.* 46, s. 1896–1904.
- (21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J. C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. ja Mehling, A. (2009). Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 55, s. 90–96.
- (22) ICCVAM (2009). ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions. NIH-julkaisunumero 10-7512. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa <http://iccvam.niehs.nih.gov/>
- (23) ILAR (1996). Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7. painos. Washington, DC: National Academies Press.
- (24) McGarry, H. F. (2007). The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.* 238, s. 71–89.
- (25) OECD (2002). Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404. Pariisi, Ranska. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html
- (26) Reeder, M. K., Broomhead, Y. L., DiDonato, L. ja DeGeorge, G. L. (2007). Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist* 96, s. 235.
- (27) ICCVAM (2009). Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>

- (28) Hayes, B. B., Gerber, P. C., Griffey, S. S. ja Meade, B. J. (1998). Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.* 21, s. 195–206.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H. C., Ruzicka, T., Ahr, H. J., Lehmann, P. ja Vohr, V. W. (1998). An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 153, s. 83–94.
- (30) Woolhiser, M. R., Hayes, B. B. ja Meade, B. J. (1998). A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.* 8, s. 245–256.
- (31) Hayes, B. B. ja Meade, B. J. (1999). Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug. Chem. Toxicol.* 22, s. 491–506.
- (32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A. O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. ja Vohr, H. W. (2005). A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.* 212, s. 60–68.
- (33) Vohr, H. W. ja Ahr, H. J. (2005). The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.* 79, s. 721–728.
- (34) Patterson, R. M., Noga, E. ja Germolec, D. (2007). Lack of evidence for contact sensitisation by Pfisteria extract. *Environ. Health Perspect.* 115, s. 1023–1028.
- (35) OECD (1987). *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402. Pariisi, Ranska. Saatavilla osoitteessa <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- (36) ICCVAM (2009). Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acuteTox/Tox_workshop.htm
- (37) OECD (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

Lisäys 1

Suoritusvaatimukset ehdotettujen samanlaisten tai mukautettujen ihoherkistys LLNA-testimenetelmien arviointia varten

JOHDANTO

1. Suoritusvaatimusten tarkoituksena on antaa arviointiperusteet, joiden avulla voidaan määrittää, ovatko uudet testimenetelmät – niin yksinoikeudelliset (eli tekijänoikeudelliset, tavaramerkityt tai rekisteröidyt) kuin muut kuin yksinoikeudelliset – riittävän tarkkoja ja luotettavia tiettyjä testaustarkoituksia varten. Näitä validoituihin ja hyväksyttyihin testimenetelmiin perustuvia suoritusvaatimuksia voidaan käyttää muiden samanlaisten menetelmien (niin sanottujen me-too-testien) luotettavuuden ja täsmällisyyden arviointiin, kun kyseiset menetelmät perustuvat samantapaisiin tieteellisiin periaatteisiin ja niillä mitataan tai ennakoitaa samaa biologista tai toksista vaikutusta (14).
2. Ennen menetelmien muuttamisen (eli hyväksytyyn testimenetelmän ehdotetun mahdollisen parantamisen) hyväksymistä on arvioitava ehdotettujen muutosten vaikutus testin suorituskykyyn ja se, missä määrin kyseiset muutokset vaikuttavat validointimenettelyn muita osia varten saatavilla oleviin tietoihin. Ehdotettujen muutosten määrästä ja luonteesta, saaduista mittaustuloksista ja kyseisiä muutoksia tukevasta asiakirja-aineistosta riippuen menetelmän muutoksille on tehtävä uudelle testille kuvaton kaltainen validointimenettely tai tarvittaessa luotettavuuden ja merkityksellisuuden rajattu arviointi käyttämällä vakiintuneita suoritusvaatimuksia (14).
3. Tähän testaustarkoitukseen käytettäväksi ehdotettujen samanlaisten tai mukautettujen menetelmien luotettavuus ja tarkkuus olisi määritettävä käyttämällä kemikaaleja, jotka edustavat kattavasti kaikkia LLNA:n pisteytysarvoja. Eläinten tarpeettoman käytön välttämiseksi suositellaan painokkaasti, että mallien kehittäjät kuulevat asiasta vastavia viranomaisia ennen validointitutkimusten käynnistämistä suoritusvaatimusten ja tässä testimenetelmässä esitettyjen ohjeiden mukaisesti.
4. Nämä suoritusvaatimukset perustuvat Yhdysvaltain US-ICCVAM:in, EU:n EC-ECVAM:in ja Japanin JaCVAM:in yhdenmukaistettuihin suoritusvaatimuksiin (12), joilla arvioidaan LLNA:n samanlaisten tai mukautettujen versioiden pätevyyttä. Suoritusvaatimukset koskevat testimenetelmän olennaisia osia, suositeltuja vertailukemikaaleja ja tarkkuus- ja luotettavuusvaatimuksia, jotka ehdotetun menetelmän olisi saavutettava tai ylitettävä.

I. Olennaiset testimenetelmän osat

5. Jotta samanlainen tai mukautettu LLNA-menetelmä vastaisi toiminnallisesti ja mekaanisesti LLNA:ta jotta varmistettaisiin, että sillä mitataan samaa biologista vaikutusta, testausprotokollassa on oltava seuraavat osat:

- Testiainetta on applikoitava paikallisesti hiiren molempiin korviin.
- Lymfosyyttien proliferaatio on mitattava niissä imusolmukkeissa, jotka dreneeraavat alueelta, johon testiaine on annosteltu.
- Lymfosyyttien proliferaatio on mitattava ihoherkistyksen induktiovaiheessa.
- Testiaineiden suurimpana valittuna annoksena on käytettävä suurinta konsentraatiota, joka ei vielä aiheuta hiiressä koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja/tai liian voimakasta paikallista ihoärsytystä. Positiivisten vertailukemikaalien suurimpana annoksena on käytettävä annosta, joka vastaa vähintään vastaavien vertailukemikaalien LLNA EC3 -arvoja (katso taulukko 1) ilman, että se aiheuttaa hiiressä koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja/tai liian voimakasta paikallista ihoärsytystä.
- Jokaiseen tutkimukseen on sisällytettävä samaan aikaan määritetty kantaja-ainekontrolliryhmä ja tarvittaessa myös samaan aikaan määritetty positiivinen kontrollikemikaali.
- Kussakin annosryhmässä on oltava vähintään neljä eläintä.
- Tietoja voidaan kerätä joko eläinkohtaisesti tai ryhmäkohtaisesti.

Jos kaikkia vaatimuksia ei täytetä, suoritusvaatimuksilla ei voida validoida samanlaista tai mukautettua menetelmää.

II. Vertailukemikaalien vähimmäisluettelo

6. Yhdysvaltain US-ICCVAM:in, EU:n EC-ECVAM:in ja Japanin JaCVAM:in yhdenmukaistetuissa suoritusvaatimuksissa (12) on määritetty 18 pakollista vähimmäisvertailukemikaalia ja neljä valinnaista vertailukemikaalia (aineita, joilla saadaan LLNA-menetelmässä aikaan vääriä positiivisia tai vääriä negatiivisia tuloksia ihmis- ja marsutestien tuloksiin verrattuna (B.6 tai OECD:n testiohje 406) (13) ja joiden avulla voidaan näin ollen osoittaa LLNA-menetelmää vastaava tai parempi suorituskky), jotka on sisällytetty LLNA-menetelmän suoritusvaatimuksiin. Näiden kemikaalien valinnassa on sovellettu seuraavia perusteita:

- Vertailukemikaalien luettelo edustaa niitä aineityyppejä, joiden ihoärsytyspotentiaalia yleensä testataan, ja kaikkia niitä vasteita, joita LLNA-menetelmällä voidaan mitata tai ennustaa.
- Aineiden kemiallinen rakenne on määritetty täsmällisesti.
- LLNA-menetelmän tiedot marsutesteistä (B.6; OECD:n testiohje 406) (13) ja mahdolliset tiedot ihmiskokeista ovat saatavilla kunkin aineen osalta.
- Aineet ovat helposti saatavilla kaupallisista lähteistä.

Suosittelut vertailukemikaalit luetellaan taulukossa 1. Ehdotetuilla vertailukemikaaleilla tehtävät tutkimukset on arvioitava siinä kantaja-aineessa, joiden kanssa ne luetellaan taulukossa 1. Jos luettelossa mainittua ainetta ei ole saatavilla, muita edellä mainitut valintaperusteet täyttäviä aineita voidaan käyttää asianmukaisin perusteluin.

Taulukko 1

Suositellut vertailukemikaalit LLNA-menetelmän suoritusvaatimuksia varten

Numero	Kemikaalit ⁽¹⁾	CAS-nro	Olomuoto	K-aine ⁽²⁾	EC3 % ⁽³⁾	N ⁽⁴⁾	0,5x – 2,0x EC3	Todellinen EC3-vaihteluväli	LLNA vs. M	LLNA vs. ihminen
1	5-Kloori-2-metyyli-4-isotiatsolin-3-oni (CMI) / 2-metyyli-4-isotiatsolin-3-oni (MI) ⁽⁵⁾	26172-55-4/2682-20-4	Nest.	DMF	0,009	1	0,0045–0,018	EL	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Kiint.	AOO	0,049	15	0,025–0,099	0,02–0,094	+/+	+/+
3	4-Fenyleenidiamiini	106-50-3	Kiint.	AOO	0,11	6	0,055–0,22	0,07–0,16	+/+	+/+
4	Kobolttikloridi	7646-79-9	Kiint.	DMSO	0,6	2	0,3–1,2	0,4–0,8	+/+	+/+
5	Isoeugenoli	97-54-1	Nest.	AOO	1,5	47	0,77–3,1	0,5–3,3	+/+	+/+
6	2-Merkaptobentsotiatsoli	149-30-4	Kiint.	DMF	1,7	1	0,85–3,4	EL	+/+	+/+
7	Sitraali	5392-40-5	Nest.	AOO	9,2	6	4,6–18,3	5,1–13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Nest.	AOO	9,7	21	4,8–19,5	4,4–14,7	+/+	+/+
9	Eugenoli	97-53-0	Nest.	AOO	10,1	11	5,05–20,2	4,9–15	+/+	+/+
10	Fenyylibentsoaatti	93-99-2	Kiint.	AOO	13,6	3	6,8–27,2	1,2–20	+/+	+/+
11	Kanelialkoholi	104-54-1	Kiint.	AOO	21	1	10,5–42	EL	+/+	+/+
12	Imidatsolidinyyliurea	39236-46-9	Kiint.	DMF	24	1	12–48	EL	+/+	+/+
13	Metyylimetakrylaatti	80-62-6	Nest.	AOO	90	1	45–100	–	+/+	+/+
14	Klooribentseeni	108-90-7	Nest.	AOO	25	1	ES	ES	–/–	–/ (*)
15	Isopropanoli	67-63-0	Nest.	AOO	50	1	ES	ES	–/–	–/+
16	Maitohappo	50-21-5	Nest.	DMSO	25	1	ES	ES	–/–	–/ (*)
17	Metyylisalisylaatti	119-36-8	Nest.	AOO	20	9	ES	ES	–/–	–/–
18	Salisyylihappo	69-72-7	Kiint.	AOO	25	1	ES	ES	–/–	–/–

Numero	Kemikaalit ⁽¹⁾	CAS-nro	Olomuoto	K-aine ⁽²⁾	EC3 % ⁽³⁾	N ⁽⁴⁾	0,5x – 2,0x EC3	Todellinen EC3-vaihteluväli	LLNA vs. M	LLNA vs. ihminen
Valinnaiset aineet, joilla osoitetaan suorituskyvyn paraneminen LLNA-menetelmään verrattuna										
19	Natriumlauryylisulfaatti	151-21-3	Kiint.	DMF	8,1	5	4,05–16,2	1,5–17,1	+/-	+/-
20	Etyleeniglykolidimetakrylaatti	97-90-5	Nest.	MEK	28	1	14–56	EL	+/-	+/+
21	Ksyleeni	1330-20-7	Nest.	AOO	95,8	1	47,9–100	EL	+/- (**)	+/-
22	Nikkelikloridi	7718-54-9	Kiint.	DMSO	5	2	ES	ES	-/+	-/+

Lyhenteet: AOO = asetoniooliöljy (4:1 v/v); CAS-nro = Chemical Abstracts Service Number; DMF = N,N-dimetyyliformamidi; DMSO = dimetyylisulfoksidi; DNCB = 2,4-dinitroklooribentseeni; EC3 = arvioitu konsentraatio, jolla saadaan aikaan stimulaatioindeksi 3; M = marsutestin tulos (B.6 tai OECD:n testiohje 406) (12); HCA = heksyylikanelialdehydi; Nest. = neste; LLNA = hiirelle tehtävän paikallisen imusolmukemääritysmenetelmän tulos (B.42 tai OECD:n testiohje 429) (1); MEK = metyylietyyliketoni; ES = ei sovelleta, koska stimulaatioindeksi < 3; EL = ei laskettu, koska tiedot on saatu yhdestä tutkimuksesta; Kiint. = kiinteä; K-aine = testissä käytettävä kantaja-aine.

(*) Oletetaan, että ei aiheuta ihoherkistystä ihmisillä, koska kliinisten lapputestien tuloksia ei ole saatavilla, sitä ei ole sisällytetty lapputestipaketin allergeeniksi eikä ihmisten herkistymisestä ole saatavilla tapaus selvityksiä.

(**) Marsutestien tietoja ei ole saatavilla.

⁽¹⁾ Kemikaalit on valmistettava päivittäin, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiiliteettitutkimuksilla.

⁽²⁾ Koska erilaiset kantaja-aineet voivat vaikuttaa LLNA-menetelmän suorituskykyyn, kullekin vertailukemikaalille suositeltua kantaja-ainetta on käytettävä (24) (32).

⁽³⁾ Keskiarvo, jos saatavilla on useampi kuin yksi EC3-arvo. Negatiivisten aineiden (stimulaatioindeksi < 3) osalta esitetään suurin testattu konsentraatio.

⁽⁴⁾ Niiden LLNA-tutkimusten määrä, joista tiedot on saatu.

⁽⁵⁾ Kaupallisesti saatavilla Kathon CG:nä (CAS-nro 55965-84-9), joka on CMI:n ja MI:n seos (3:1). Kunkin osan suhteelliset konsentraatiot vaihtelevat välillä 1,1–1,25 % (CMI) ja 0,3–0,45 % (MI). Inaktiivisina osina ovat magnesiumsuolat (21,5–24 %) ja kuparinitraatti (0,15–0,17 %), ja muu osa valmisteesta (74–77 %) on vettä. Kathon CG on helposti saatavilla Sigma-Aldrich-yrityksen ja Rohm and Haas -yrityksen (nykyisin Dow Chemical Corporation) välityksellä.

III. Määritellyt luotettavuus- ja tarkkuusvaatimukset

7. Samanlaisen tai mukautetun LLNA-menetelmän tarkkuuden on oltava yhtä suuri tai suurempi kuin LLNA-suoritusvaatimuksissa määritelty tarkkuus, kun sitä arvioidaan käyttämällä 18:aa säädettyä vähimmäisvertailukemikaalia. Uudella tai mukautetulla menetelmällä on voitava suorittaa oikea luokittelu, joka perustuu kyllä/ei-päätökseen. Uudella tai mukautetulla menetelmällä ei kuitenkaan välttämättä voida luokitella asianmukaisesti kaikkia säädettyjä vähimmäisvertailukemikaaleja. Jos esimerkiksi yksi heikkoa herkistystä aiheuttavista aiheista luokitellaan väärin, vastaava suorituskyky voidaan osoittaa esittämällä virheellisen luokittelun perustelut ja muut tarvittavat tiedot (esimerkiksi testitulokset, joilla saadaan oikea sellaisten muiden aineiden luokittelu, joiden fyysiset, kemialliset ja herkistävät ominaisuudet vastaavat väärin luokitellun vertailukemikaalin ominaisuuksia). Tällaisessa tilanteessa uuden tai mukautetun LLNA-testimenetelmän validoinnin tila arvioidaan tapauskohtaisesti.

Laboratorionsisäinen uusittavuus

8. Laboratorionsisäisen uusittavuuden määrittämiseksi uutta tai mukautettua LLNA-menetelmää on arvioitava käyttämällä herkistävää ainetta, jonka ominaisuudet on LLNA-menetelmässä määritetty hyvin. Sen vuoksi LLNA-menetelmän suoritusvaatimukset perustuvat heksyylikanelialdehydillä (HCA) toistuvasti tehtyjen testien tulosten vaihteluun. Laboratorionsisäisen luotettavuuden arvioimiseksi HCA:n kynnyskonsentraatioarviot (ECt) on määritettävä neljässä eri testissä niin, että testit tehdään vähintään viikon välein. Laboratorionsisäinen uusittavuus hyväksytään, jos laboratorion kussakin HCA-testissä ECt:ksi saadaan 5–20 %, mikä vastaa LLNA-menetelmässä 0,5–2,0 kertaa HCA:lle määritettyä keskimääräistä EC3:a (10 %) (katso taulukko 1).

Laboratoriodenvälinen uusittavuus

9. Uuden tai mukautetun LLNA-menetelmän laboratoriodenvälistä uusittavuutta on arvioitava käyttämällä kahta herkistävää ainetta, joiden ominaisuudet on LLNA-menetelmässä määritetty hyvin. LLNA-menetelmän suoritusvaatimukset perustuvat HCA:lla ja 2,4-dinitroklooribentseenillä (DNCB) eri laboratorioissa tehtyjen testien tulosten vaihteluun. ECt on määritettävä riippumattomasti yhden sellaisen tutkimuksen perusteella, joka tehdään vähintään kolmessa eri laboratorioissa. Laboratoriodenvälinen uusittavuus hyväksytään, jos kussakin laboratorioissa ECt:ksi saadaan HCA-testissä 5–20 % ja DNCB-testissä 0,025–0,1 %, mikä vastaa LLNA-menetelmässä 0,5–2,0 kertaa HCA:lle määritettyä keskimääräistä EC3:a (10 %) ja DNCB:lle määritettyä EC3:a (0,05 %) (katso taulukko 1).

Lisäys 2

Määritelmät

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksytyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus mittaa testimenetelmän suorituskykyä, ja se on yksi merkityksellisyuden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssi) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (14).

Vertailuaine: Herkistävä tai muu kuin herkistävä aine, jota käytetään testiaineen vertailustandardina. Vertailuaineella olisi oltava seuraavat ominaisuudet: i) luotettava alkuperä, joka pysyy samana; ii) samanlainen rakenne ja toiminta kuin testattavana olevalla aineyyellä; iii) tunnetut fysikaaliskemialliset ominaisuudet, iv) sopivuutta tukevia tietoja tunnetuista vaikutuksista ja v) tunnettu voimakkuus tavoitellun vasteen vaihteluvälillä.

Kynnyskonsentraatioarvio (ECt): Testiaineen arvioitu konsentraatio, jolla saadaan aikaan stimulaatioindeksi, joka osoittaa positiivisen vasteen.

Kynnyskonsentraatio-3 (EC3): Testiaineen arvioitu konsentraatio, jolla saadaan aikaan stimulaatioindeksi 3.

Väärä negatiivinen: Testiaine on testimenetelmässä määritetty väärin perustein negatiiviseksi tai inaktiiviseksi, vaikka se itse asiassa on positiivinen tai aktiivinen.

Väärä positiivinen: Testiaine on testimenetelmässä määritetty väärin perustein positiiviseksi tai aktiiviseksi, vaikka se itse asiassa on negatiivinen tai inaktiivinen.

Vaarallisuus: Mahdollisuus kielteiseen terveys- tai ympäristövaikutukseen. Kielteinen vaikutus edellyttää altistumista vähintään tietyllä tasolla.

Laboratoriodenvälinen uusittavuus: Se, missä määrin erilaiset valtuutetut laboratoriot voivat saada aikaan laadullisesti ja määrällisesti samanlaisia tuloksia käyttämällä samoja tutkimussuunnitelmia ja testaamalla samoja testiaineita. Laboratoriodenvälinen uusittavuus määritetään esivalidointi- ja validointimenettelyssä, ja sillä osoitetaan, missä määrin testi voidaan onnistuneesti toteuttaa eri laboratorioissa (14).

Laboratorionsisäinen uusittavuus: Se, missä määrin tietyn laboratorion pätevä henkilöstö voi saada onnistuneesti aikaan samat tulokset käyttämällä tiettyä tutkimussuunnitelmaa eri ajankohtina (14).

Me-too-testi: Puhekielinen nimitys testimenetelmälle, joka on rakenteellisesti ja funktionaalisesti samanlainen kuin validoitu ja hyväksytty vertailutestimenetelmä. Tällainen menetelmä voitaisiin myös validoida. Tarkoittaa samaa kuin 'samanlainen' testimenetelmä (14).

Käyrän ulkopuolella oleva vaste: Käyrän ulkopuolella olevalla vasteella tarkoitetaan havaintoa, joka poikkeaa merkittävästi muista populaation satunnaistetuista arvoista.

Suoritusvaatimukset: Validoituun testimenetelmään perustuvat vaatimukset, joiden avulla arvioidaan ehdotetun toiminnallisesti ja mekanistisesti samanlaisen testimenetelmän vertailtavuutta. Suoritusvaatimuksiin sisältyvät i) testimenetelmän oleelliset osat; ii) vähimmäisluettelo vertailukemikaaleista, jotka on valittu niiden kemikaalien joukosta, joita on käytetty osoittamaan validoidun vertailumenetelmän hyväksyttävää suorituskykyä; ja iii) samanlaiset validoidusta testimenetelmästä saatuihin tuloksiin perustuvat tarkkuuden ja luotettavuuden tasot, jotka ehdotetun testimenetelmän olisi osoitettava, kun sitä arvioidaan vertailuaineiden vähimmäisluettelon avulla (14).

Yksinoikeudellinen testimenetelmä: Testimenetelmä, jonka valmistamista ja jakelua rajoitetaan patenteilla, tekijänoikeuksilla, tavaramerkeillä ynnä muilla.

Laadunvarmistus: Hallintomenettely, jossa testausta suorittavista henkilöistä riippumattomat henkilöt arvioivat laboratorion testausstandardien, vaatimusten ja kirjanpitoimenettelyjen noudattamista ja tiedonsiirron tarkkuutta.

Vertailukemikaalit: Validointimenettelyyn valitut kemikaalit, joiden vasteet *in vitro* -vertailutestijärjestelmässä tai *in vivo* kyseisessä lajissa ovat tiedossa. Näiden kemikaalien on vastattava niitä kemikaaliluokkia, joiden yhteydessä kyseistä testimenetelmää todennäköisesti käytetään, ja niiden on edustettava kaikkia niitä vasteita, joita testimenetelmän kohteena olevilta kemikaaleilta voidaan odottaa (voimakkaista lieviin ja negatiivisiin). Validointimenettelyn eri vaiheita sekä eri testimenetelmiä ja testitarkoituksia varten voidaan vaatia erilaisia vertailukemikaaleja (14).

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja aineen vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa kyseisen aineen biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (konkordanssi) (14).

Luotettavuus: Testimenetelmän uusittavuus samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa pitkällä aikavälillä käytettäessä samaa menettelyä. Se arvioidaan laskemalla laboratorionsisäinen ja laboratoriodenvälinen uusittavuus (14).

Ihoherkistys: Immunologinen prosessi, joka aiheutuu herkän yksilön paikallisesta altistamisesta kemialliselle allergeenille, joka aiheuttaa iholla immuunivasteen, joka voi johtaa kosketusherkistykseen.

Stimulaatioindeksi (SI): Testiaineen ihoärsytyspotentiaalin arvioimiseksi laskettu arvo, jolla esitetään käsiteltyjen ryhmien soluproliferaation ja samaan aikaan kantaja-aineella käsitellyn kontrolliryhmän soluproliferaation välinen suhde.

Testiaine (testikemikaali): Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Validoitu testimenetelmä: Testimenetelmä, jolle on tehty validointitutkimukset sen merkityksellisyyden (myös tarkkuuden) ja luotettavuuden määrittämiseksi tiettyä tarkoitusta varten. On syytä pitää mielessä, että validoidun testimenetelmän suorituskyky tarkkuuden ja luotettavuuden osalta ei välttämättä ole riittävä, jotta se voitaisiin hyväksyä ehdotettuun tarkoitukseen (14)."

2. Korvataan B.46 luku seuraavasti:

"B.46. *IN VITRO* -IHOÄRSYTTÄVYYS: REKONSTRUOIDUN IHMISORVASKEDEN TESTIMENETELMÄ

JOHDANTO

- Ihoärsytyksellä tarkoitetaan korjautuvan ihovaurion syntymistä enintään neljä tuntia kestäneen testiaineen annostelun jälkeen (kuten on määritelty Yhdistyneiden kansakuntien (YK) GHS-järjestelmässä (Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemical Substances and Mixtures) ja aineiden ja seosten luokitukselta, merkinnöistä ja pakkaamisesta 16 päivänä joulukuuta 2008 annetussa Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksessa (EY) N:o 1272/2008 (CLP-asetus) (1) (3)). Tässä testimenetelmässä selostetaan *in vitro* -menettely, jolla voidaan määrittää ärsyttävien kemikaalien (aineiden ja seosten) vaarallisuus YK:n GHS-järjestelmän ja EU:n CLP-asetuksen luokan 2 mukaisesti (1) (2) (3). EU:ssa ja muilla alueilla, joilla ei ole hyväksytty YK:n GHS-järjestelmän valinnaista luokkaa 3 (lievästi ärsyttävät aineet), tätä testimenetelmää voidaan käyttää myös luokittelemattomien kemikaalien (YK:n GHS-järjestelmän ja EU:n CLP-asetuksen 'ei luokitusta') määrittämiseen (1) (3). Tämän testimenetelmän avulla voidaan määrittää kemikaalien ihoärsytys yksittäisenä korvaavana testinä vaiheittaisen testausstrategian *in vivo* -ihoärsytystestauksen asemesta (4 ja tämän liitteen B.4 luku).

2. Ihoärsyttävyyden arviointi on tyypillisesti edellyttänyt koe-eläinten käyttöä (OECD:n testiohje 404; tämän liitteen B.4 luku) (4). Eläinten hyvinvointiin liittyvien näkökohtien osalta menetelmää B.4 tarkistettiin vuonna 2004 niin, että ihosyövyttävyyden ja ihoärsyttävyyden voidaan määrittää soveltamalla vaihteista testausstrategiaa käyttäen *in vitro*- tai *ex vivo*-testimenetelmiä, joiden avulla vältetään eläimille aiheutuva kipu ja kärsimys. Kolme validoitua *in vitro*-testimenetelmää on hyväksytty OECD:n testiohjeina 430, 431 ja 435 (5) (6) (7) ja kaksi tämän liitteen B.40 ja B.40a lukuna, ja niitä voidaan käyttää menetelmän B.4 ja OECD:n testiohjeen 404 vaihteista testausstrategian syövyttävyyssiossa (4).
3. Tässä testimenetelmässä tarkastellaan ihoärsytystä ihmisten terveyteen liittyvänä määrityskohteena. Tämä testimenetelmä perustuu ihmisen rekonstruoituun orvasketeen (Reconstructed human Epidermis, RhE), joka jäljittelee läheisesti ihmisen iholle ylemmän kerroksen eli epidermisen biokemiallisia ja fysiologisia ominaisuuksia (solut ovat peräisin ihmisen orvaskeden keratinosyyteistä, ja testissä käytetään edustavaa kudosta- ja soluarkkitehtuuria). Tähän testimenetelmään sisältyy myös sarja suoritusvaatimuksia (lisäys 2), joilla voidaan arvioida samanlaisia ja muunnettuja rekonstruoituun ihmisorvasketeen perustuvia menetelmiä. Suoritusvaatimukset on kehittänyt EC-ECVAM (8) OECD:n ohjearkistojen nro 34 (9) periaatteiden mukaisesti.
4. On olemassa kolme validoitua menetelmää, joissa noudatetaan tätä testimenetelmää. Validointia edeltävää vaihetta, optimointia ja validointia koskevat tutkimukset on saatettu päätökseen sen *in vitro*-menetelmän (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) osalta, jossa käytetään rekonstruoitua ihmisorvaskesimallia ja joka on kaupallisesti saatavilla nimellä EpiSkinTM (validoitu vertailumenetelmä, VVM). Kahdesta muusta kaupallisesti saatavilla olevasta ihoärsytysten *in vitro*-menetelmästä, joissa käytetään RhE-menetelmää, on saatu samankaltaisia tuloksia kuin VVM:stä suoritusvaatimuksiin perustuvan validoinnin (21) perusteella. Nämä menetelmät ovat EpiDermTM-ihoärsytystesti (EPI-200) ja SkinEthicTM-RhE-menetelmät (22).
5. Ennen kuin ehdotettua samanlaista tai mukautettua *in vitro*-RhE-menetelmää, joka ei ole VVM, EpiDermTM-ihoärsytystesti (EPI-200) tai SkinEthicTM-RhE-menetelmä, voidaan käyttää lainsäädännössä määriteltäviin tarkoituksiin, sen luotettavuus, merkittävyys (tarkkuus) ja ehdotetun käytön rajoitukset on määriteltävä, jotta voidaan varmistaa, että sitä voidaan verrata VVM:ään tässä testimenetelmässä (lisäys 2) vahvistetuissa suoritusvaatimuksissa asetettujen vaatimusten mukaisesti. Lisäksi suositellaan, että ennen samanlaisen tai mukautetun *in vitro*-RhE-menetelmän validointia ja toimittamista sääntelyviranomaisten hyväksyttäväksi on syytä tarkastella *in vitro*-ihoärsytystestausta koskevaa OECD:n perusteluasiakirjaa (23).

MÄÄRITELMÄT

6. Sovellettavat määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

ALUSTAVIA POHDINTOJA JA RAJOITUKSET

7. Validointitutkimuksen (16) mukaisesti tämän testimenetelmän rajoituksena on, että kemikaalien luokittelu YK:n GHS-luokkaan 3 (lievästi ärsyttävät aineet) (1) ei ole mahdollista. Myöhemmin tehtävä *in vivo*-testaus voi olla tarpeen osittain korvaavana testinä ihoärsytyspotentiaalien ominaisuuksien täydellistä määrittämistä varten (4 ja tämän liitteen B.4 luku). On syytä muistaa, että ihmisen iholle käyttöön liittyy kansallisia ja kansainvälisiä eettisiä näkökohtia ja ehtoja.
8. Tässä testimenetelmässä tarkastellaan ihoärsyttävyyttä/-syövyttävyyttä koskevan B.4 menetelmän vaihteista testausstrategian *in vitro*-ihoärsyttävyyssiossa (OECD:n testiohje 404) (4). Vaikka tällä testimenetelmällä ei saada riittävästi tietoja ihosyövyttävyydestä, on syytä panna merkille, että ihosyövyttävyyttä koskeva B.40a menetelmä (OECD:n testiohje 431) perustuu samaan RhE-testijärjestelmään, mutta siinä käytetään muuta tutkimussuunnitelmaa (B.40a luku). Tässä selostettu menetelmä perustuu RhE-malleihin, joissa käytetään ihmisistä peräisin olevia keratinosyyttejä, jotka näin ollen edustavat tarkasteltavana olevan lajin kohde-elintä *in vitro*. Menetelmä kattaa suoraan myös aluksi esiintyvän tulehdusreaktion ja/tai reaktiomekanismin (soluvauriot ja paikalliseen vammaan johtavat kudosaauriot), joka tapahtuu *in vivo*-ärsytyksen aikana. Tämän testimenetelmän validoinnin yhteydessä on testattu useita erilaisia kemikaaleja, ja validointitutkimuksessa kerättyyn tietopankkiin käsitteä yhteensä 58 kemikaalia (16) (18) (23). Menetelmää voidaan käyttää testien aineisiin, nesteisiin, puolikiinteisiin aineisiin ja vahamaisiin aineisiin. Nesteet voivat olla vesiliukoisia tai orgaanisia liukoisia; kiinteät aineet voivat olla joko veteen liukenevia tai veteen liukenemattomia. Kiinteät aineet on mahdollisuuksien mukaan jauhettava hienoksi jauhoksi ennen applikointia; näytteen muuta esikäsittelyä ei vaadita. Kaasuja ja aerosoleja ei ole vielä arvioitu validointitutkimuksessa (24). Vaikka voidaan ajatella, että niitä voidaan testata RhE-tekniikalla, tällä testimenetelmällä kaasuja ja aerosoleja ei voida testata. On myös pantava merkille, että voimakkaaväriset kemikaalit voivat häiritä solujen elinkyvyn mittausta, joten on käytettävä mukautettuja kontrolleja (katso 24–26 kohta).
9. Kun testikemikaalin luokittelu on yksiselitteinen, se voidaan testata yhdessä kolme kudosaurytta käsittelevässä testiajossa. Jos luokittelu on vaikeaa, esimerkiksi jos rinnakkaisnäytteille saadut tulokset ovat erilaiset ja/tai jos keskimääräinen elinkyky on $50 \pm 5\%$, on harkittava toista testiajota ja myös kolmatta, jos kahden ensimmäisen testin tulokset poikkeavat toisistaan.

TESTIN PERIAATE

10. Testikemikaalia applikoidaan paikallisesti kolmiulotteiseen rekonstruoituun ihmisorvaskesimalliin, joka koostuu ihmisestä saaduista muuntamattomista orvaskeden keratinosyyteistä, jotka on viljelty ihmisen orvaskeden monikerroksiseksi, täysin erilaistuneitten solujen malliksi. Se koostuu järjestyneistä ja selkeistä tyvisolu-, okasolu- ja jyväiskerroksista ja monikerroksisesta marraskedestä, joka sisältää solujenvälisiä lamellaarisia lipidikerroksia, jotka edustavat lipidiluokkia, joita havaitaan myös *in vivo*-kokeissa.

11. Kemikaalien aiheuttama ihoärsytys, joka esiintyy eryteemana ja ödeemana, on seurauksena tapahtumasarjasta, joka käynnistyy, kun kemikaali läpäisee marraskeden, ja alla olevat keratinosyyttikerrokset vaurioituvat. Kuolevat keratinosyytit vapauttavat välittäjäaineita, jotka käynnistävät tulehdusreaktion, joka vaikuttaa verinahan soluihin, etenkin strooman ja endoteelin soluihin. Havaitut eryteema ja ödeema johtuvat endoteelin solujen laajentumisesta ja tavallista suuremmasta läpäisevyydestä (24). RhE-mallin perustuvilla menetelmillä mitataan tämän tapahtumasarjan käynnistäviä tapahtumia.
12. Solujen elinkyvyn mittausta perustuu siihen, että entsyymit muuntavat väriaine MTT:n (3-(4,5-dimetyyli-2-tyyli)-2,5-difenyyli-tetrasoliumbromidi, tiatsolyylisinen; CAS-numero 298-93-1) siniseksi formatsaanisuolaksi, joka mitataan kvantitatiivisesti, kun se on uutettu kudoksista (25). Ärsytystä aiheuttavat aineet tunnistetaan niiden kyvystä alentaa solun elinkyä määritettyjen kynnysarvojen alle (ts. $\leq 50\%$ YK:n GHS-järjestelmän / EU:n CLP-asetuksen luokan 2 osalta). Riippuen siitä sääntely-yhteydestä, jossa tämän testimenetelmän tuloksia käytetään, voidaan katsoa, että kemikaalit, jotka aiheuttavat määritettyä kynnysarvoa korkeamman solujen elinkyvyn, eivät ole ärsyttäviä (ts. $> 50\%$, ei luokitusta).

PÄTEVYYDEN OSOITUS

13. Ennen kuin laboratoriot ryhtyvät käyttämään rutiininomaisesti jotakin tämän testimenetelmän mukaisista kolmesta validoidusta menetelmästä, laboratorioden on osoitettava tekninen pätevytensä taulukossa 1 lueteltujen kymmenen vertailukemikaalin avulla. Tämän testimenetelmän mukaisesti kehitettyjen samanlaisten menetelmien tai kolmen validoidun menetelmän mukautusten osalta tämän testimenetelmän lisäyksessä 2 vahvistetut suoritusvaatimukset on täytettävä, ennen kuin niitä käytetään lainsäädännössä edellytettyihin testeihin.
14. Osana pätevyyden osoittamista käyttäjän on kudosten vastaanoton jälkeen tarkastettava kudosten läpäisevyyssominaisuudet RhE-mallin laatijan vaatimusten mukaisesti. Tämä on erityisen tärkeää, jos kudoksia kuljetetaan pitkiä välimatkoja tai pitkiä aikoja. Kun menetelmä on otettu onnistuneesti käyttöön ja laboratorion pätevyys on osoitettu, tällaista tarkastusta ei tarvitse tehdä säännöllisesti. Jos menetelmää käytetään säännöllisesti, on läpäisevyyssominaisuudet kuitenkin jatkossakin syytä arvioida säännöllisin väliajoin.

Taulukko 1

Vertailukemikaalit ⁽¹⁾

Kemikaali	CAS-nro	In vivo-tulos ⁽²⁾	Fysikaalinen olomuoto	YK:n GHS-luokka / EU:n CLP-luokka
naftaleenietikkahappo	86-87-3	0	kiinteä	ei luokitusta
isopropanoli	67-63-0	0,3	neste	ei luokitusta
metyylistearaatti	112-61-8	1	kiinteä	ei luokitusta
heptylibutyaatti	5870-93-9	1,7	neste	ei luokitusta (valinnainen luokka 3) ⁽³⁾ ⁽⁴⁾
heksyyლისისლაatti	6259-76-3	2	neste	ei luokitusta (valinnainen luokka 3) ⁽³⁾ ⁽⁴⁾
syklameenialdehydi	103-95-7	2,3	neste	luokka 2
1-bromiheksaani	111-25-1	2,7	neste	luokka 2
kaliiumhydroksidi (5 % liuos vedessä)	1310-58-3	3	neste	luokka 2
1-metyyli-3-fenyyli-1-piperatsiini	5271-27-2	3,3	kiinteä	luokka 2
heptanaali	111-71-7	3,4	neste	luokka 2

⁽¹⁾ Nämä vertailukemikaalit muodostavat osan validointitutkimuksessa käytettävistä vertailukemikaaleista.

⁽²⁾ In vivo -pisteytystulos B.4-menetelmän ja OECD:n testiohjeen 404 ⁽⁴⁾ mukaisesti.

⁽³⁾ Tässä testimenetelmässä katsotaan, että YK:n GHS-järjestelmän valinnainen luokka 3 (lievästi ärsyttävät aineet) (1) vastaa luokitusta 'ei luokitusta'.

⁽⁴⁾ YK:n GHS-järjestelmän valinnaista luokkaa 3 ei sovelleta EU:n CLP-asetuksessa.

MENETTELY

15. Seuraavassa esitellään RhE-menetelmää käyttävän ihoärsyttävyyssarvioinnin osat ja menettelyt. RhE-malli on valmistettava, ja se voidaan valmistaa itse laboratoriossa tai hankkia kaupallisesti. EpiSkinTM-menetelmän, EpiDermTM-ihoärsytystestin (EPI-200) ja SkinEthicTM-RhE-menetelmän standardimenettelyt ovat saatavilla lähteissä (26) (27) (28). Testaus on toteutettava seuraavasti:

RhE-TESTIMENETELMÄN osat*Yleiset olosuhteet*

16. Epiteelin valmistamiseen on käytettävä muuntamattomia ihmisen keratinosyyttejä. Toimivan marraskeden alla on oltava useita kerroksia eläviä epiteelisoluja (tyvisolukerros, okasolukerros ja jyväiskerros). Marraskedessä on oltava useita kerroksia ja olennainen lipidikoostumus, jotta se voi toimia esteenä solumyrkyllisten merkkiaineiden, kuten natriumdodekyylisulfaatin (SDS) tai Triton X-100:n, nopealle kulkeutumiselle ihokerrosten läpi. Läpäisytestokyky on osoitettava, ja se voidaan arvioida joko määrittämällä pitoisuus, jossa merkkiaine vähentää kudosten elinkykyä 50 prosentilla (IC₅₀) tietyn altistusajan jälkeen, tai määrittämällä altistusaika, joka tarvitaan solun elinkyvyn vähenemiseen 50 prosentilla (ET₅₀) applikoidessa merkkiainetta tietyssä, tunnetussa pitoisuudessa. Mallin on oltava sellainen, ettei materiaali pääse marraskeden ympäri elävään kudokseen, koska se heikentäisi mallin kykyä mallintaa ihoaltistusta. RhE-mallissa ei saa olla kontaminaatiota (bakteerit, virukset, mykoplasmat tai sieni-itiöt).

*Toimintaolosuhteet**Solujen elinkyky*

17. Solujen elinkyky määritetään MTT-määritysmenetelmällä (25). RhE-mallien käyttäjien on varmistettava, että kukin RhE-mallin erä täyttää negatiiviselle kontrollille asetetut vaatimukset. Pelkän uuttoliuottimen optisen tiheyden (OD) on oltava riittävän pieni, ts. OD < 0,1. RhE-mallin kehittäjän/tuottajan on määritettävä negatiivisen kontrollin OD-arvojen hyväksyttävyyden vaihteluväli (ylempi ja alempi raja-arvo) (ihoärsytystestimenetelmän olosuhteissa). Kolmen validoidun menetelmän hyväksyttävyyden vaihteluvälit esitetään taulukossa 2. Negatiivisella kontrollikemikaalilla käsiteltyjen kudosten vakaus viljelmässä (niiden on annettava samanlaiset elinkykytulokset) testin altistusjakson ajan on dokumentoitava.

Taulukko 2

Negatiivisen kontrollin OD-arvojen hyväksyttävyyden vaihteluväli

	Alempi hyväksyttävyyssrja	Ylempi hyväksyttävyyssrja
EpiSkin TM (ihomalli)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm TM -ihoärsytystesti (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic TM -RhE-menetelmä	≥ 1,2	≤ 2,5

Läpäisyn esto

18. Marraskeden ja sen lipidikoostumuksen on oltava riittävä estämään solumyrkyllisten merkkiaineiden, esimerkiksi SDS:n tai Triton X-100:n, nopea läpäisy arvioituna IC₅₀-llä tai ET₅₀-llä (taulukko 3).

Morfologia

19. RhE-malli on tutkittava histologisesti, ja on osoitettava, että rekonstruktioilla on ihmisen orvaskeden kaltainen rakenne (myös monikerroksinen marraskesi).

Uusittavuus

20. Testimenetelmän positiivisella kontrollikemikaalilla ja negatiivisilla kontrolleilla saatujen tulosten olisi osoitettava tulosten uusittavuus pidemmällä aikavälillä.

Laadunvalvonta

21. RhE-mallin kehittäjän/tuottajan on varmistettava ja osoitettava, että kukin RhE-mallin erä täyttää määritellyt tuotantokriteerit, joiden joukosta *elinkykyisyys* (17 kohta), *läpäisyn estoa* (18 kohta) ja *morfologiaa* (19 kohta) koskevat perusteet ovat merkityksellisimmät. Tätä koskevat tiedot on annettava menetelmän käyttäjille, jotta he voivat ilmoittaa tiedot testiraportissa. RhE-mallin kehittäjän/tuottajan (tai laitoksen omaa mallia käytettäessä tutkijan) on annettava IC₅₀:n tai ET₅₀:n hyväksyttävyyden vaihteluväli (ylempi ja alempi raja-arvo). Ainoastaan hyväksytyillä kudoksilla saadut tulokset voidaan hyväksyä luotettavaksi ennusteeksi ärsytyksen luokittelua varten. Edellä käsiteltyjen kolmen validoidun menetelmän hyväksyttävyyden vaihteluvälit esitetään esimerkkeinä taulukossa 3.

Taulukko 3

Esimerkkejä laadunvalvonnan perusteista erän vapauttamiseksi tehtaalta myyntiin

	Alempi hyväksyttävyyssraja	Ylempi hyväksyttävyyssraja
EpiSkin™ (ihomalli) (18 tunnin käsittely SDS:llä) (26)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™-ihoärsytystesti (EPI-200) (1 % Triton X-100) (27)	ET ₅₀ = 4,8 tuntia	ET ₅₀ = 8,7 tuntia
SkinEthic™-RhE-menetelmä (1 % Triton X-100) (28)	ET ₅₀ = 4,0 tuntia	ET ₅₀ = 9,0 tuntia

Testi- ja kontrollikemikaalien annostelu

22. Kutakin testikemikaalia ja kunkin käsittelyn kontrollia kohti on käytettävä vähintään kolmea näytettä. Sekä nestemäisiä että kiinteitä aineita käytettäessä orvaskeden pinnalle on annosteltava testikemikaalia tasaisesti riittävä määrä kuitenkin niin, ettei käytetä hyvin suurta annosta. Kemikaalia olisi käytettävä vähintään 25 µl/cm² tai 25 mg/cm². Kiinteitä aineita käytettäessä orvaskeden pinta on kostutettava deionisoidulla tai tislatusella vedellä ennen aineen annostelua, jotta testikemikaalin ja orvaskeden pinnan välistä kosketus olisi parempi. Kiinteät aineet on mahdollisuuksien mukaan testattava hienona jauheena. Altistuksen jälkeen testikemikaali on huuhdeltava huolellisesti orvaskeden pinnalta sopivalla vesipitoisella puskuriliuoksella tai 0,9-prosenttisella NaCl:lla. Kolmesta validoidusta RhE-menetelmästä valitusta menetelmästä riippuen altistusaika voi olla 15–60 minuuttia ja inkubaatiolämpötila 20–37 °C. Nämä altistusajat ja lämpötilat on optimoitu erikseen kullekin RhE-menetelmälle, ja ne vastaavat menetelmien erilaisia ominaispiirteitä; lisätietoja on saatavilla menetelmien standardimenettelyistä (26) (27) (28).
23. Kussakin käsittelyssä on käytettävä samanaikaisesti negatiivisia ja positiivisia kontroleja osoittamaan, että solujen elinkyky (negatiivisella kontrollilla), läpäisyn esto ja altistuksesta seuraava kudoksen herkistyminen (positiivisella kontrollilla) ovat pidemmän ajan kuluessa määritetyllä hyväksyttävyyden vaihteluvälillä. Positiivisena kontrolliaineena suositellaan käytettäväksi 5-prosenttista SDS:n vesiliuosta. Suositeltavat negatiiviset kontrollikemikaalit ovat vesi tai fosfaattipuskuroitu suolaliuos (PBS).

Solujen elinkykymittaukset

24. Tärkeintä testimenettelyssä on se, että elinkykymittauksia ei suoriteta heti testikemikaaleille altistumisen jälkeen, vaan vasta, kun kudokset on käsittelyn jälkeen huuhdeltu ja ne ovat olleet riittävän pitkän inkubaatioajan tuoreessa elatusaineessa. Inkubaatioaika mahdollistaa sekä palautumisen heikoista sytotoksista vaikutuksista että selkeiden sytotoksisten vaikutusten esilletulon. Testin optimointivaiheessa (11) (12) (13) (14) (15) on käynyt ilmi, että 42 tuntia kestävä inkubaatioaika käsittelyn jälkeen on optimaalinen.
25. MTT-määritysmenetelmä on validoitu kvantitatiivinen menetelmä, jota olisi käytettävä solujen elinkyvyn mittaamiseen tässä testimenetelmässä. MTT-menetelmä sopii käytettäväksi kolmiulotteisen kudostekniikan kanssa. Kudostäyte pannaan kolmeksi tunniksi sopivan vahvuiseen MTT-liuokseen (esimerkiksi 0,3–1 mg/ml). Saostunut sininen formaani uutetaan kudoksesta liuottimella (esimerkiksi isopropanoli tai hapan isopropanoli), ja formatsoinnipitoisuus määritetään mittaamalla OD-arvo 570 ± 30 nm:ssä.
26. Testikemikaalin optiset ominaisuudet tai sen kemiallinen reaktio MTT:n kanssa voivat aiheuttaa sen, että määritysmenetelmällä saadaan väärä arvio elinkyvystä (koska testikemikaali voi estää värin muodostumisen tai vaihtoehtoisesti aiheuttaa sen). Näin voi tapahtua, jos tietty testikemikaali ei kokonaan poistu kudoksesta huuhdeltamalla tai jos se imeytyy orvasketeen. Jos testikemikaali reagoi suoraan MTT:n kanssa (MTT-pelkistin), on luonnostaan värillinen tai värjäytyy kudoksen käsittelyn aikana, on käytettävä lisäkontroleja, jotta testikemikaalin vaikutus solujen elinkyvyn mittaukseen voidaan osoittaa ja korjata. MTT:n suoran pelkistymisen ja väriaineiden aiheuttamien häiriöiden korjaamismenettelyt selostetaan yksityiskohtaisesti kyseisiä kolmea validoitua menetelmää koskeissa standardimenettelyissä (26) (27) (28).

Hyväksyttävyyssperusteet

27. Jokaisessa menetelmässä, jossa käytetään validoidun RhE-mallin eriä (katso 21 kohta), negatiivisella kontrollikemikaalilla käsiteltyjen kudosten OD:n vastattava sellaisten kudosten OD:tä, joille on suoritettu kaikki kuljetus- ja vastaanottovaiheet sekä kaikki tutkimussuunnitelman menettelyt. Kontrollien OD-arvot eivät saa olla alhaisemmat kuin pitkäkhön aiemman ajanjakson alemmat rajat. Vastaavasti positiivisella kontrollilla eli 5-prosenttisella SDS:n vesiliuoksella käsiteltyjen kudosten on ilmennettävä kudosten kykyä reagoida ärsytystä aiheuttavaan kemikaaliin tässä testimenetelmässä (26) (27) (28). Rinnakkaisten kudosten välisen vaihtelun asianmukaiset määrät on määriteltävä (esimerkiksi jos käytetään vakiopoikkeamia, niiden on oltava aiempien tietojen perusteella lasketun 1-puolisen 95 prosentin vaihteluvälin sisällä; validoiduille vertailumenetelmille vakiopoikkeama < 18 %).

Tulosten tulkinta ja ennustettavuusmalli

28. Negatiivisen kontrollin OD-arvon katsotaan testissä edustavan 100-prosenttista solujen elinkyä. Kullakin testikemikaalilla saaduista OD-arvoista voidaan laskea solujen elinky prosentteina negatiivisesta kontrollista. Prosentuaalinen solujen elinkyvyn raja-arvo, jolla ärsyttävät testikemikaalit erotetaan luokittelemattomista testikemikaaleista, ja tulosten arviointiin ja ärsyttävien kemikaalien tunnistamiseen käytettävät tilastomenetelmät on määriteltävä selvästi ja dokumentoitava ja niiden sopivuus on osoitettava. Ärsytyksen ennusteen raja-arvot esitetään seuraavassa:

- Testikemikaalin katsotaan aiheuttavan ärsytystä iholla YK:n GHS-järjestelmän / EU:n CLP-asetuksen luokan 2 mukaisesti, jos kudoksen elinky alituksen ja käsittelyn jälkeisen inkubaation jälkeen on alhaisempi tai yhtä suuri kuin ($\leq$) 50 prosenttia.
- Riippuen siitä, minkä säädöksen noudattaminen tulee kysymykseen tämän testimenetelmän yhteydessä, voidaan katsoa, että testikemikaali ei aiheuta ärsytystä iholla YK:n GHS-järjestelmän / EU:n CLP-asetuksen luokituksen 'ei luokitusta' mukaisesti, jos kudoksen elinky alituksen ja käsittelyn jälkeisen inkubaation jälkeen on suurempi kuin ($>$) 50 prosenttia.

MITTAUSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN*Mittaustulokset*

29. Kunkin testin osalta on esitettävä taulukkomuodossa yksittäisiä rinnakkaisia testinäytteitä koskevat mittaustulokset (esimerkiksi kunkin testikemikaalin OD-arvot ja solujen elinkyvyn prosentuaalista osuutta koskevat tiedot, mukaan luettuna luokittelu) ja tarvittaessa myös mittaustulokset toistetuista kokeista. Lisäksi on esitettävä kunkin käsittelyn keskiarvo $\pm$ keskihajonta. Kunkin testikemikaalin osalta on esitettävä havaittu vuorovaikutus MTT-reagenssin ja värilisten testikemikaalien kanssa.

Testiraportti

30. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testi- ja kontrollikemikaalit

- kemiallinen nimi/kemialliset nimet, kuten CAS-nimi ja -numero sekä EC-nimi ja -numero, jos ne tiedetään,
- kemikaalin puhtaus ja koostumus (painoprosentteina),
- tutkimuksen suorittamisen kannalta merkitykselliset fysikaaliskemialliset ominaisuudet (kuten fysikaalinen olemuoto, stabiilius ja haihtuvuus, pH ja vesiliukoisuus, jos se tiedetään),
- tarvittaessa testi- tai kontrollikemikaalien käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen),
- varastointiolosuhteet.

*Käytetyn RhE-mallin ja testisuunnitelman perustelut**Testiolosuhteet*

- käytetty solujärjestelmä,
- täydelliset RhE-mallin käyttöä tukevat tiedot (mukaan luettuna mallin suoritusarvot). Näitä voivat olla, luette-
lon olematta tyhjentyvä,
 - i) solujen elinky
 - ii) läpäisy esto
 - iii) morfologia
 - iv) uusittavuus ja ennustettavuus
 - v) mallin laatukontrollit,
- tiedot käytetystä testimenetelmästä,
- testissä käytetyt annokset, altistuksen kesto ja käsittelyn jälkeinen inkubaatioaika,
- kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista,

- viittaukset mallia koskeviin aiempiin tietoihin. Näitä voivat olla, luettelon olematta tyhjentävä,
 - i) laatukontrollitietojen hyväksyttävyy; viitattava aikaisempia eriä koskeviin tietoihin
 - ii) positiivisten ja negatiivisten kontrollien hyväksyttävyy; viitattava positiivisten ja negatiivisten kontrollien keskiarvoihin ja vaihteluväleihin,
- käytettyjen arviointiperusteiden kuvaus, mukaan luettuina ennustettavuusmallin raja-arvojen valinnan perusteet,
- viittaukset aiempiin kontrollitietoihin.

Tulokset

- yksittäisistä testikemikaaleista saadut tulokset kussakin testiajossa ja rinnakkaisista mittauksista taulukkomuodossa,
- tiedot kontrolleista, joita on käytetty suorille MTT:n pelkistimille ja/tai värjääville testikemikaaleille,
- kuvaus muista havaituista vaikutuksista.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDELUETTELO

- (1) YK (2009). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). 3. tarkistettu painos. YK, New York ja Geneve. Saatavilla osoitteessa http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html
- (2) EC-ECVAM (2009). Statement on the 'Performance under UN GHS of three *in vitro* assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards'. ECVAM:in tieteellinen neuvoo-antava komitea (ESAC30), 9. huhtikuuta 2009. Saatavilla osoitteessa <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>
- (3) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta. EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1.
- (4) OECD (2004). Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- (5) OECD (2004). *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 430. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- (6) OECD (2004). *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 431. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- (7) OECD (2006). *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 435. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- (8) EC-ECVAM (2009). Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE)? Saatavilla osoitteessa <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>
- (9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- (10) Fentem, J. H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G. R., Harbell, J. W., Heylings, J. R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J. J. M. ja Botham, P. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, Results and evaluation by the Management Team. *Toxicol. in Vitro* 15, s. 57–93.
- (11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. ja Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study. *Toxicol. in Vitro* 16, s. 765–770.
- (12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. ja Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests. *ALTEX* 21, s. 107–114.
- (13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. ja Spielmann, H. (2005). The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests – An assessment of the performance of the optimised test. *ATLA* 33, s. 351–367.

- (14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. ja Rubinstein, G. (2005). The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process. ATLA 33, s. 329–349.
- (15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P. A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R. D., Elliot, G. R., Fentem, J. H., Heylings, J. R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J. J. M., Wiemann, C. ja Worth, A. (2002). Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2. ATLA 30, s. 109–129.
- (16) Spielmann, H., mailto:Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., mailto:Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. ja Zuang, V. (2007). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test. ATLA 35, s. 559–601.
- (17) Hoffmann, S. (2006). ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1- α . Saatavilla osoitteessa <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>
- (18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. ja Zuang, V. (2007). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals. ATLA 35, s. 603–619.
- (19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonnaud, E. ja Leclaire, J. (2007). *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy – Results and performances with 184 cosmetic ingredients. AATEX 14, s. 351–358.
- (20) EC-ECVAM (2007). Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation. ECVAM:in tieteellinen neuvoa-antava komitea (ESAC26), 27. huhtikuuta 2007. Saatavilla osoitteessa <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>
- (21) EC-ECVAM (2007). Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Saatavilla osoitteessa <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>
- (22) EC-ECVAM (2008). Statement on the scientific validity of *in vitro* tests for skin irritation testing. ECVAM:in tieteellinen neuvoa-antava komitea (ESAC29), 5. marraskuuta 2008. Saatavilla osoitteessa <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>
- (23) OECD (2010). Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. OECD Series on Testing and Assessment, No. 137. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html
- (24) Welss, T., Basketter, D. A. ja Schröder, K. R. (2004). *In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models. Toxicol. in Vitro 18, s. 231–243.
- (25) Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65, s. 55–63.
- (26) EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (helmikuu 2009). ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min – 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Saatavilla osoitteessa <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>
- (27) EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (tarkistettu versio, maaliskuu 2009). Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Saatavilla osoitteessa <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>
- (28) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (helmikuu 2009). SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Saatavilla osoitteessa <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>
- (29) Harvell, J. D., Lamminstausta, K. ja Maibach, H. I. (1995). Irritant contact dermatitis. Practical Contact Dermatitis, s. 7–18 (Toim. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.
- (30) Komission direktiivi 2001/59/EY, annettu 6 päivänä elokuuta 2001, vaarallisten aineiden luokitusta, pakkaamista ja merkintöjä koskevien lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä annetun neuvoston direktiivin 67/548/ETY mukauttamisesta tekniikan kehitykseen kahdennenkymmenennenkahdeksannen kerran. EYVL L 225, 21.8.2001, s. 1.
- (31) Basketter, D. A., York, M., McFadden, J. P. ja Robinson, M. K. (2004). Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. Contact Dermatitis 51, s. 1–4.

- (32) Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M. ja Kandarova, H. (2007). Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal *in vivo* data. *ALTEX* 14, s. 359–365.
- (33) Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. ja Kandárová, H. (2010). Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data. *Contact Dermatitis* 62, s. 109–116.

Lisäys 1

Määritelmät

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksytyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisuuden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssia) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (9).

Solujen elinkyky: Muuttuja, jolla mitataan solupopulaation kokonaisaktiivisuutta, esimerkiksi solujen mitokondrioiden dehydrogenaasin kykyä pelkistää väriaine MTT (3-(4,5-dimetyyliatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi eli tiatsolyylisininen), joka mitatusta pääte pisteestä ja testimenetelmästä riippuen korreloi solujen kokonaismäärään ja/tai elinkykyyn.

Vastaavuus: Testimenetelmän suorituskyvyn mitta sellaisille testimenetelmille, joiden tulokset ovat luokittelevia, ja yksi merkityksellisuuden osatekijöistä. Vastaavuutta ja tarkkuutta käytetään usein toisiaan korvaavasti, ja vastaavuus on määritely kaikkien niiden testikemikaalien osuudeksi, jotka on luokiteltu oikein positiivisiksi tai negatiivisiksi (9).

ET₅₀: Voidaan arvioida määrittämällä altistus aika, joka tarvitaan, jotta solujen elinkyky vähenee 50 prosenttia annosteltaessa merkkikemikaalia tietyssä, määrättyssä pitoisuudessa; katso myös IC₅₀.

EU:n CLP-asetus (aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta 16 päivänä joulukuuta 2008 annettu Euroopan parlamentin ja neuvoston asetusta (EY) N:o 1272/2008): Kemikaalien (aineiden ja seosten) luokittelua ja merkintöjä koskeva YK:n GHS-järjestelmä saatetaan tällä asetuksella osaksi Euroopan unionin (EU) lainsäädäntöä (3).

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals; Yhdistyneiden kansakuntien (YK) kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja -tasojen mukaisesti, ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten ja ympäristön suojelemiseksi (esimerkiksi työntäjille, työtekijöille, kuljetushenkilökunnalle, kuluttajille ja pelastushenkilöstölle) (1).

IC₅₀: Voidaan arvioida määrittämällä pitoisuus, jossa merkkikemikaali alentaa solujen elinkykyä 50 prosentilla (IC₅₀) sovitun altistusajan jälkeen; katso myös ET₅₀.

Rajoittamaton annos: Orvasketeen applikoidun testikemikaalin määrä, joka ylittää määrän, joka tarvitaan orvaskeden pinnan peittämiseksi kokonaisuudessaan ja tasaisesti.

Me-too-testi: Puhekielinen nimitys testimenetelmälle, joka on rakenteellisesti ja funktionaalisesti samanlainen kuin validoitu ja hyväksytty vertailutestimenetelmä. Tällainen menetelmä voitaisiin myös validoida. Tarkoittaa samaa kuin samanlainen testimenetelmä (9).

Suoritusvaatimukset: Validoituihin vertailumenetelmiin perustuvat standardit, jotka toimivat perustana arvioitaessa ehdotetun mekaanisesti ja toiminnallisesti samanlaisen testimenetelmän vertailtavuutta. Siihen sisältyvät i) testimenetelmän oleelliset osat; ii) vähimmäisluettelo vertailukemikaaleista, jotka on valittu niiden kemikaalien joukosta, joita on käytetty osoittamaan validoidun vertailumenetelmän hyväksyttävää suorituskykyä; ja iii) vertailukelpoiset validoidusta testimenetelmästä saatuihin tuloksiin perustuvat tarkkuuden ja luotettavuuden tasot, jotka ehdotetun testimenetelmän olisi osoitettava, kun sitä arvioidaan vertailukemikaalien vähimmäisluettelon avulla (9).

Vertailukemikaalit: Validointimenettelyyn valitut kemikaalit, joiden vasteet *in vitro*- tai *in vivo*-vertailutestijärjestelmässä tai kyseisessä lajissa ovat tiedossa. Näiden kemikaalien olisi edustettava niitä kemikaaliluokkia, joita testattaessa kyseistä testimenetelmää todennäköisesti käytetään, ja niiden on edustettava kaikkia niitä vasteita, joita tällä testimenetelmällä testattavilta kemikaaleilta voidaan odottaa (voimakkaista lieviin ja negatiivisiin). Validointimenettelyn eri vaiheita sekä eri testimenetelmiä ja testitarkoituksia varten voidaan vaatia erilaisia vertailukemikaaleja (9).

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (vastaavuus) (9).

Luotettavuus: Laajuus, jolla testimenetelmä on uusittavissa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa menettelyä. Se arvioidaan laskemalla laboratorionsisäinen ja laboratoriodenväläinen uusittavuus (9).

Korvaava testi: Testi, jolla voidaan korvata testi, joka on säännöllisesti käytössä ja joka on hyväksytty vaarallisuuden määrittämiseen ja/tai riskien arviointiin, ja jonka on osoitettu antavan ihmisten tai eläinten terveyden tai tarvittaessa ympäristön kannalta vastaavan tai korkeamman suojelutason hyväksytyyn testiin verrattuna kaikissa mahdollisissa testaustilanteissa ja kaikkien kemikaalien yhteydessä (9).

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (9).

Ihoärsyttävyyys: Palautuvan ihovaurion ilmaantuminen enintään neljä tuntia kestäneen testikemikaalin annostelun jälkeen. Ihoärsytys on paikallisesti esiintyvä, ei-immunogeeninen reaktio, joka kehittyy pian stimulaation jälkeen (29). Sen tärkeimmät ominaispiirteet ovat sen palautuvuus, johon liittyy tulehdusreaktioita, ja useimmat tulehdusreaktioihin liittyvät ärsyttävyyden kliiniset ominaispiirteet (eryteema, ödeema, kutina ja kipu).

Spesifisyys: Niiden negatiivisten/inaktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. On tärkeää ottaa spesifisyys huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (9).

Vaiheittainen testausstrategia: Testaus, jossa testimenetelmiä käytetään peräkkäin; testimenetelmät valitaan kullekin peräkkäiselle tasolle edellisen testaustason tulosten perusteella (9).

Testikemikaali (testiaine): Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Lisäys 2

Suoritusvaatimukset ehdotettujen samanlaisten tai mukautettujen rekonstruoituun ihmisorvasketeen (RhE) perustuvien ihoärsytyksen *in vitro* -menetelmien arviointia varten

JOHDANTO

1. Suoritusvaatimusten tarkoituksena on antaa perusta, jolla voidaan määrittää, ovatko yksinoikeudelliset (eli tekijänoikeudelliset, tavaramerkityt tai rekisteröidyt) ja muut kuin yksinoikeudelliset uudet menetelmät riittävän täsmällisiä ja luotettavia tiettyä testaustarkoitusta varten. Näitä validoituihin ja hyväksytyihin testimenetelmiin perustuvia suoritusvaatimuksia voidaan käyttää muiden samanlaisten menetelmien (niin sanottujen me-too-testien) luotettavuuden ja täsmällisyyden arviointiin, kun kyseiset menetelmät perustuvat vastaaviin tieteellisiin periaatteisiin ja niillä mitataan tai ennakoidaan samanlaista biologista tai toksista vaikutusta (9).
2. Ennen mukautettujen menetelmien (eli hyväksytyn menetelmän mahdollisten parannusehdotusten) hyväksymistä on arvioitava ehdotettujen muutosten vaikutus testin suorittamiseen ja se, missä määrin kyseiset muutokset vaikuttavat validointimenettelyn muita osia varten saatavilla oleviin tietoihin. Ehdotettujen muutosten määrän ja luonteen, saatujen tietojen ja kyseisiä muutoksia tukevan aineiston mukaisesti ne on joko validoitava samalla tavalla kuin uusi testi tai, mikäli se on asianmukaista, niiden luotettavuus ja merkityksellisyys on arvioitava suppeammin käyttämällä vakiintuneita suoritusvaatimuksia (9).
3. Tätä testiä varten käytettäväksi ehdotettujen kolmen validoidun menetelmän (EpiSkinTM (validoitu vertailumenetelmä – VVM), EpiDermTM-ihoärsytystesti (EPI-200) ja SkinEthicTM-RhE-menetelmä) samanlaisten (me-too-menetelmät) tai mukautettujen menetelmien luotettavuus ja täsmällisyys on määritettävä käyttämällä kemikaaleja, jotka edustavat koko Draizen ihoärsytyksen pisteytysasteikkoa. Kun ehdotettu menetelmä arvioidaan käyttämällä suoritusvaatimuksissa suositeltuja 20:tä vertailukemikaalia (taulukko 1), ehdotettujen samanlaisten tai mukautettujen menetelmien luotettavuus- ja tarkkuusarvojen on vastattava VVM:stä saatuja arvoja tai oltava niitä parempia (taulukko 2) (2) (16). Luotettavuus- ja tarkkuusarvot, jotka on saavutettava, esitetään tässä lisäyksessä olevissa 8–12 kohdassa. Vertailukemikaaleissa on mukana luokittelemattomia (YK:n GHS-järjestelmän / EU:n CLP-asetuksen 'ei luokitusta') ja luokiteltuja (YK:n GHS-järjestelmän / EU:n CLP-asetuksen luokka 2) (1), erilaisia kemikaaliluokkia edustavia kemikaaleja, joten ehdotetun menetelmän luotettavuutta ja tarkkuutta (herkkyttä, spesifisyyttä ja yleistä tarkkuutta) VVM:n luotettavuuteen ja tarkkuuteen voidaan verrata. Menetelmän luotettavuus sekä sen kyky tunnistaa oikein YK:n GHS-järjestelmän / EU:n CLP-asetuksen luokkaan 2 kuuluvat ärsytystä aiheuttavat kemikaalit sekä – riippuen siitä säännöstöstä, jota varten tietoja tuotetaan – myös sen kyky tunnistaa oikein YK:n GHS-järjestelmän / EU:n CLP-asetuksen luokkaan 'ei luokitusta' kuuluvat kemikaalit olisi määritettävä, ennen kuin menetelmää käytetään uusien testikemikaalien testaamiseen.

4. Nämä suoritusvaatimukset perustuvat EC-ECVAM:in suoritusvaatimuksiin (8), jotka on saatettu ajan tasalle luokitusta ja merkintöjä koskevien YK:n GHS-järjestelmän ja EU:n CLP-asetuksen mukaisesti (1) (3). Alkuperäiset suoritusvaatimukset määriteltiin validointitutkimuksen (21) suorittamisen jälkeen, ja ne perustuivat EU:n luokittelujärjestelmään, josta säädetään vaarallisten aineiden luokitusta, pakkaamista ja merkintöjä koskevien lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä annetun neuvoston direktiivin 67/548/ETY mukauttamisesta tekniikan kehitykseen kahdennenkymmenennenkahdeksannen kerran 6 päivänä elokuuta 2001 annetulla komission direktiivillä 2001/59/EY ⁽¹⁾. Koska YK:n GHS-järjestelmä hyväksyttiin EU:n luokitus- ja merkintäjärjestelmäksi (EU:n CLP-asetus) (3) validointitutkimuksen päätökseen saattamisen ja tämän testimenetelmän lopullisen version laatimisen välisenä aikana, suoritusvaatimuksia on saatettu ajan tasalle (8). Nämä ajan tasalle saattamiseksi tehtävät tarkistukset koskevat pääasiassa muutoksia i) suoritusvaatimuksissa mainituissa vertailukemikaaleissa ja ii) määriteltyjä luotettavuus- ja tarkkuusarvoja (2) (23).

SUORITUSVAATIMUKSET REKONSTRUOITUUN IHMISORVASKETEEN (RhE) PERUSTUVIA IHOÄRSYTYKSEN IN VITRO -TESTIMENETELMIÄ VARTEN

5. Suoritusvaatimukset koostuvat seuraavista kolmesta osasta (9):

- I) testimenetelmän oleelliset osat
- II) vertailukemikaalien vähimmäisluettelo
- III) määritellyt luotettavuus- ja tarkkuusarvot

I) Testimenetelmän oleelliset osat

6. Nämä koostuvat validoidun menetelmän oleellisista rakenteellisista, toiminnallisista ja menettelyihin liittyvistä osista, jotka on sisällytettävä ehdotetun mekaanisesti tai toiminnallisesti samanlaisen tai mukautetun menetelmän testisuunnitelmaan. Näitä osia ovat vain kyseisellä menetelmällä olevat ominaisuudet, menettelyihin liittyvät ratkaisevan tärkeät yksityiskohdat sekä laadunvalvontamenettelyt. Testimenetelmän oleellisia osia koskevia vaatimuksia noudattamalla varmistetaan, että ehdotettu samanlainen tai mukautettu menetelmä perustuu samoihin tekijöihin kuin vastaava VVM (9). Testimenetelmän oleelliset osat kuvataan yksityiskohtaisesti testimenetelmän 16–21 kohdassa, ja testaus olisi tehtävä seuraavien kohtien mukaisesti:

- yleiset ehdot (16 kohta)
- funktionaaliset ehdot, joihin kuuluvat
 - solujen elinkyky (17 kohta),
 - läpäisy esto (18 kohta),
 - morfologia (19 kohta),
 - uusittavuus (20 kohta) ja
 - laadunvalvonta (21 kohta).

II) Vertailukemikaalien vähimmäisluettelo

7. Vertailukemikaalien avulla määritetään, onko ehdotettu samanlainen tai mukautettu menetelmä, joka on osoitettu rakenteellisesti ja toiminnallisesti riittävän samanlaiseksi VVM:ään verrattuna, tai joka on jonkin edellä mainituista kolmesta validoidusta menetelmästä vähäinen mukautus, yhtä luotettava ja tarkka tai luotettavampi tai tarkempi kuin VVM (2) (8) (16) (23). Taulukossa 1 lueteltuihin 20 suositeltuun vertailukemikaaliin on sisällytetty kemikaaleja erilaisista kemiallisista luokista (eli funktionaalsiin ryhmiin perustuvista kemikaaliluokista), ja ne edustavat koko Draizen ihoärsytyksen pisteytysasteikkoa (ärsyttämättömästä erittäin ärsyttävään). Luetteloon on sisällytetty kymmenen YK:n GHS-järjestelmän / EU:n CLP-asetuksen luokan 2 kemikaalia ja kymmenen luokittelematonta kemikaalia, joista kolme on YK:n GHS-järjestelmän valinnaisen luokan 3 kemikaaleja. Tässä testimenetelmässä valinnainen luokka 3 katsotaan luokaksi 'ei luokitusta'. Taulukossa 1 luetellut kemikaalit on valittu esivalidointia seuraavassa optimointivaiheessa ja VVM:n validointitutkimuksessa käytetyistä kemikaaleista niin, että huomioon on otettu kemiallinen funktionaalisuus ja fysikaalinen olomuoto (14) (18). Nämä vertailukemikaalit edustavat niiden kemikaalien vähimmäismäärää, joita on käytettävä ehdotetun samanlaisen tai mukautetun menetelmän tarkkuuden ja luotettavuuden arvioimiseksi. Niitä ei kuitenkaan pidä käyttää uusien menetelmien kehittämiseksi. Jos lueteltu kemikaali ei ole saatavilla, myös muita kemikaaleja voidaan käyttää, jos niistä on saatavilla asianmukaiset *in vivo* -vertailutiedot. Tällaiset kemikaalit on valittava ensisijaisesti niistä kemikaaleista, joita on käytetty esivalidointia seuraavassa optimointivaiheessa tai VVM:n validointitutkimuksessa. Vertailukemikaalien vähimmäisluetteloon voidaan tarvittaessa lisätä muita kemikaaliluokkia edustavia kemikaaleja, joista on saatavilla asianmukaiset *in vivo* -vertailutiedot, jotta ehdotetun menetelmän tarkkuutta voidaan arvioida yksityiskohtaisemmin.

⁽¹⁾ EYVL L 225, 21.8.2001, s. 1.

Taulukko 1

Samanlaisten tai mukautettujen RhE-ihöärsytysmenetelmien tarkkuus- ja luotettavuusarvojen määrittämisessä käytettävien vertailukemikaalien vähimmäisluettelo ⁽¹⁾

Kemikaali	CAS-nro	Fysikaalinen olomuoto	In vivo -tulos	VRM in vitro-luokka	YK GHS / EU CLP in vivo-luokka
1-bromi-4-klooributaani	6940-78-9	neste	0	luokka 2	ei luokitusta
dietyyliftalaatti	84-66-2	neste	0	ei luokitusta	ei luokitusta
naftaleenietikkahappo	86-87-3	kiinteä	0	ei luokitusta	ei luokitusta
allyylifenoksisetaatti	7493-74-5	neste	0,3	ei luokitusta	ei luokitusta
isopropanoli	67-63-0	neste	0,3	ei luokitusta	ei luokitusta
4-(metyyli-)-bentsaldehydi	3446-89-7	neste	1	luokka 2	ei luokitusta
metyylistearaatti	112-61-8	kiinteä	1	ei luokitusta	ei luokitusta
heptylibutyyraatti	5870-93-9	neste	1,7	ei luokitusta	ei luokitusta
heksyyliisilylaatti	6259-76-3	neste	2	ei luokitusta	ei luokitusta
kanelialdehydi	104-55-2	neste	2	luokka 2	ei luokitusta (valinnainen luokka 3) ⁽³⁾
1-dekanoli ⁽²⁾	112-30-1	neste	2,3	luokka 2	luokka 2
syklameenialdehydi	103-95-7	neste	2,3	luokka 2	luokka 2
1-bromiheksaani	111-25-1	neste	2,7	luokka 2	luokka 2
2-kloorimetyyli-3,5-dimetyyli-4-metoksipyridiinihydrokloridi	86604-75-3	kiinteä	2,7	luokka 2	luokka 2
di-n-propyyliidisulfidi ⁽²⁾	629-19-6	neste	3	ei luokitusta	luokka 2
kaliumhydroksidi (5 % liuos vedessä)	1310-58-3	neste	3	luokka 2	luokka 2
bentseenitioli, 5-(1,1-dimetyyli-2-metyyli-)	7340-90-1	neste	3,3	luokka 2	luokka 2
1-metyyli-3-fenyyli-1-piperatsiini	5271-27-2	kiinteä	3,3	luokka 2	luokka 2
heptanaali	111-71-7	neste	3,4	luokka 2	luokka 2
tetrakloorietyleni	127-18-4	neste	4	luokka 2	luokka 2

⁽¹⁾ Kemikaalit valitaan seuraavin perustein: i) kemikaalit ovat kaupallisesti saatavilla; ii) ne edustavat koko Draizen ärsyttävyyssysteijästä (ärsyttämättömästä erittäin ärsyttävään); iii) niiden kemiallinen rakenne on tarkkaan määritetty; iv) niiden kemiallinen funktio on sama kuin validointiprosessissa käytettyjen kemikaalien; ja v) niillä ei ole erittäin toksisia ominaisuuksia (esimerkiksi karsinogeenisia tai lisääntymisjärjestelmälle myrkyllisiä ominaisuuksia), eivätkä niiden loppusijoituskustannukset saa olla niin suuret, että ne estäisivät menetelmän käytön.

⁽²⁾ Kemikaalit, jotka aiheuttavat ärsytystä kanille mutta jotka luotettavien todisteiden mukaan eivät aiheuta ärsytystä ihmisille (31) (32) (33).

⁽³⁾ YK:n GHS-järjestelmässä, ei EU:n CLP-asetuksessa

III) Määritellyt luotettavuus- ja tarkkuusarvot

8. Kun ehdotettuja samanlaisia tai mukautettuja menetelmiä on tarkoitus käyttää monissa laboratorioissa, on luotettavuuden ja merkityksellisuuden määrittämiseksi kaikki taulukossa 1 esitetyt 20 vertailukemikaalia testattava vähintään kolmessa laboratorioissa. Jos ehdotettua menetelmää aiotaan käyttää vain yhdessä laboratorioissa, ei validointiin vaadita useissa laboratorioissa tehtävää testausta. On kuitenkin tärkeää, että kansainvälisesti tunnustetut validointielimet arvioivat kyseisiä validointitutkimuksia riippumattomasti kansainvälisten ohjeiden mukaisesti (9). Kaikki 20 vertailukemikaalia on testattava kussakin laboratorioissa kolmella erillisellä testiajolla, jotka suoritetaan eri kudosnäytteillä ja riittävän pitkän ajan kuluttua toisistaan. Kussakin testiajossa on testattava samanaikaisesti vähintään kolme rinnakkaista kudosnäytettä jokaista testattavaa testikemikaalia sekä negatiivista kontrollikemikaalia ja positiivista kontrollikemikaalia kohti.
9. Ehdotetun menetelmän luotettavuus- ja tarkkuusarvot on laskettava niin, että huomioon otetaan seuraavat neljä perustetta, ja on varmistettava, että luotettavuus- ja tarkkuusarvot lasketaan ennalta määritetyllä ja johdonmukaisella tavalla:
 1. Vain täydellisistä testeistä saatuja tietoja voidaan käyttää menetelmän laboratorionsisäisen ja laboratoriodenvälisen vaihtelun ja ennustettavuuden (tarkkuuden) laskemiseksi.
 2. Kunkin osallistuvan laboratorion kunkin vertailukemikaalin lopullinen luokittelu on tehtävä käyttämällä täydellisen testin eri testikerroilla saatujen solujen elinkyvyn arvojen keskiarvoa.
 3. Vain sellaisista kemikaaleista saadut tiedot, joille on tehty täydelliset testit kaikissa osallistuvissa laboratorioissa, voidaan ottaa huomioon laskettaessa menetelmän laboratoriodenvälisestä vaihtelua.
 4. Tarkkuusarvot on laskettava osallistuvissa laboratorioissa 20 vertailukemikaalille tuotettujen yksittäisten laboratorionnusteiden perusteella.

Tässä yhteydessä **testikerta** (testiajo) koostuu tietyn laboratorion tietylle testikemikaalille tekemästä kolmesta riippumattomasta testauksesta. **Täydellisellä testiajolla** tarkoitetaan tietyssä laboratorioissa tietyille testikemikaalille tehtyä testiä, jonka kaikki kolme ajoa ovat valideja. Tämä tarkoittaa, että yksikin hylätty ajo/testikerta johtaa koko kolmesta testiajosta koostuvan täydellisen testiajon hylkäämiseen.

Laboratorionsisäinen uusittavuus

10. Laboratorion sisäisen uusittavuuden arvioinnilla on osoitettava, että tietyssä laboratorioissa 20 vertailukemikaalilla suoritettujen yksittäisillä, erillisillä testikerroilla saadut luokitellut vastaavat vähintään 90-prosenttisesti YK:n GHS-järjestelmän tai EU:n CLP-asetuksen luokitusta (luokka 2 tai ei luokitusta).

Laboratoriodenvälinen uusittavuus

11. Laboratoriodenvälisen uusittavuuden arviointi ei ole tarpeen, jos ehdotettua menetelmää aiotaan käyttää vain yhdessä laboratorioissa. Jotta menetelmiä voitaisiin käyttää useissa laboratorioissa, mieluiten kolmessa eri laboratorioissa 20 vertailukemikaalilla suoritetuilla yksittäisillä, erillisillä testikerroilla saatujen luokitusten olisi vastattava vähintään 80-prosenttisesti YK:n GHS-järjestelmän tai EU:n CLP-asetuksen luokitusta (luokka 2 tai ei luokitusta).

Ennustettavuusi (tarkkuus)

12. Ehdotetun samanlaisen tai mukautetun menetelmän tarkkuuden (herkkyyden, spesifisyyden ja yleisen tarkkuuden) on oltava yhtä suuri tai suurempi kuin VVM:n, kun kohdelajin osalta otetaan huomioon täydentävät merkityksellisyttä koskevat tiedot (taulukko 2). Herkkyyden on oltava yhtä suuri tai suurempi kuin ($\geq$) 80 prosenttia (2) (8) (23). Ehdotetun *in vitro* -menetelmän herkkyyteen sovelletaan kuitenkin erityistä rajoitusta: vain kaksi luokkaan 2 kuuluvaa *in vivo* -kemikaalia, *1-dekanoli* ja *di-n-propyyliidisulfidi*, saadaan luokitella väärin useammassa kuin yhdessä osallistuvassa laboratorioissa. Spesifisyyden on oltava yhtä suuri tai suurempi kuin ($\geq$) 70 prosenttia (2) (8) (23). Ehdotetun *in vitro* -menetelmän spesifisyyteen ei sovelleta muita rajoituksia. Toisin sanoen mikä tahansa osallistuva laboratorio saa luokitella ei luokitusta -luokkaan kuuluvan *in vivo* -kemikaalin väärin edellyttäen, että testimenetelmän lopullinen spesifisyys on hyväksyttävällä vaihteluvälillä. Yleisen tarkkuuden on oltava yhtä suuri tai suurempi kuin ($\geq$) 75 prosenttia (2) (8) (23). Vaikka taulukossa 1 lueteltujen vertailukemikaalien perusteella lasketun VVM:n herkkyys on yhtä suuri kuin 90 prosenttia, samanlaisen tai mukautetun menetelmän hyväksymiseen vaadittu herkkyyden vähimmäisarvo on määritetty 80 prosentiksi, koska tiedetään, että *1-dekanoli* (kemikaalina rajatapaus) ja *di-n-propyyliidisulfidi* (VVM:n väärä negatiivinen) eivät aiheuta ärsytystä ihmisille (31) (32) (33), vaikka niiden on määritetty aiheuttavan ärsytystä kanitesteissä. Koska RhE-mallit perustuvat ihmisestä saatuihin soluihin, niissä voidaan ennustaa, että kyseiset kemikaalit eivät ärsytä (YK:n GHS-järjestelmän / EU:n CLP-asetuksen 'ei luokitusta').

Taulukko 2

Samanlaisen tai mukautetun menetelmän validoimiseksi vaaditut herkkyyden, spesifisyyden ja yleisen tarkkuuden ennustearvot

Herkkyys	Spesifisyys	Yleinen tarkkuus
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Tutkimuksen hyväksymisperusteet

13. On mahdollista, että yhteen tai useampaan testikemikaaliin liittyvässä yhdessä tai useammassa testissä ei täytetä testi- ja vertailukemikaaleihin sovellettavia testien hyväksymisperusteita tai että sitä/niitä ei voida hyväksyä muista syistä. Kullekin testikemikaalille voidaan puuttuvien tietojen täydentämiseksi tehdä enintään kaksi täydentävää testiä ('uudelleentestaus'). Tarkemmin sanottuna kullakin testikemikaalilla voidaan tehdä enintään kaksi täydentävää testiajoa, koska uudelleentestauksen yhteydessä myös positiiviset ja negatiiviset vertailukemikaalit on testattava samanaikaisesti.
14. Mahdollisesti vielä uudelleentestauksen jälkeenkin kaikilla vertailukemikaaleilla ei saada aikaan kunkin testattavan kemikaalin osalta vaadittuja vähintään kolmea hyväksyttyä ajoa kaikissa osallistuvissa laboratorioissa. Näin ollen tietomatriisi ei ole täydellinen. Tällaisessa tapauksessa kaikki seuraavat kolme vaatimusta olisi täytettävä, jotta tiedot katsotaan hyväksyttäväksi:
1. Kaikille 20 vertailukemikaalille on tehty vähintään yksi täydellinen testiajo.
 2. Kussakin (vähintään kolme) osallistuvassa laboratorioissa vähintään 85 prosenttia testiajoista ovat täydellisiä (20 kemikaalia; yhdessä laboratorioissa sallitaan kolme hylättyä testiä).
 3. Vähintään 90 prosenttia kaikista mahdollisista vähintään kolmen laboratorion testiajoista ovat täydellisiä (20 kemikaalia, testattu kolmessa laboratorioissa; yhteensä kuusi hylättyä testiajoa sallitaan)."
3. Lisätään seuraavat luvut:

"B.49. IN VITRO -MIKROTUMATESTI NISÄKÄSSOLUILLA**JOHDANTO**

1. *In vitro* -mikrotumamääritysmenetelmä (MNvit) on genotoksisuustesti, jolla määritetään interfaasisolujen sytoplasman mikrotumat. Mikrotumat voivat olla peräisin asentrisista kromosomin osista (joista puuttuu sentromeeri) tai kokonaisista kromosomeista, jotka eivät pysty vetäytymään kohti napoja solunjakautumisen anafaasivaiheessa. Määritysmenetelmässä osoitetaan klastogeenisten ja aneugeenisten kemikaalien (aineiden ja seosten) (1) (2) aktiivisuus soluissa, joissa on tapahtunut solun jakautuminen testiaineelle altistumisen aikana tai sen jälkeen. Testi voidaan suorittaa niin, että aktiinin polymerisaation inhibiittoria sytokalasiini B:tä (sytoB) käytetään tai ei käytetä. Kun sytoB:tä lisätään ennen tavoiteltua mitotoosi, mikrotumafrekvenssi voidaan määrittää ja analysoida valikoivasti soluissa, joissa on tapahtunut yksi mitotoosi, koska tällaiset solut ovat kaksitumaisia (3) (4). Tässä testimenetelmässä testisuunnitelmia voidaan soveltaa myös ilman sytokineesin inhibitointia edellyttäen, että analysoitavassa solupopulaatiossa on todistettusti tapahtunut mitotoosi.
2. Mikrotumien muodostumista aiheuttavien kemikaalien (aineiden ja seosten) tunnistamiseksi toteutettavan MNvit-määritysmenetelmän lisäksi kromosomivaurioiden ja mikrotuman muodostumisen mekanismeista voidaan saada tietoa myös käyttämällä sytokineesin inhibiittoria, kinetokorian immunokemiallista merkkiainetta tai sentromeeri-/telomeerikoettimilla suoritettavaa hybridisaatiota (fluoresenssi- *in situ* -hybridisaatio (FISH)) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Merkki- ja hybridisaatiomenetelmiä voidaan käyttää, kun mikrotumien muodostuminen on kiihtynyt ja tutkija haluaa määrittää, johtuuko kiihtyminen klastogeenisista ja/tai aneugeenisista tapahtumista.
3. Mikrotumat edustavat vauriota, jotka ovat välittyneet tytärsoluihin. Sen sijaan metafaasivaiheen soluissa esiintyvät kromosomipoikkeavuudet eivät ehkä välity seuraaviin vaiheisiin. Koska interfaasisolujen mikrotumat voidaan havaita suhteellisen objektiivisesti, laboratorion henkilökunnan on vain määritettävä, ovatko solut jakautuneet ja kuinka monessa solussa on mikrotuma. Näin ollen preparaattit voidaan laskea suhteellisen nopeasti ja analysointi voidaan automatisoida. Tämän takia kussakin käsittelyssä voidaan laskea satojen solujen sijaan tuhansia soluja, mikä lisää määritysmenetelmän tehokkuutta. Koska mikrotumia voi syntyä hitaasti liikkuvista ('lagging') kromosomeista, menetelmällä voidaan havaita aneuploidisia tekijöitä, joita on vaikea tutkia perinteisillä kromosomipoikkeavuustesteillä, kuten OECD:n testiohjeella 473 (tämän liitteen B.10 luku) (17). MNvit-määritysmenetelmällä ei kuitenkaan voida eritellä polyploidisia kemikaaleja ja klastogeenisiä kemikaaleja ilman erityistekniikoita, kuten 2 kohdassa tarkoitettua FISH-tekniikkaa.

4. MNvit-määrittämismenetelmä on *in vitro* -menetelmä, jossa tavallisesti käytetään viljeltyjä ihmis- tai jyrsijäsoluja. Sillä voidaan kattavasti tutkia *in vitro* kromosomivaurioiden mahdollisuutta, koska sillä voidaan havaita sekä aneugeenit että klastogeenit.
5. MNvit-määrittämismenetelmässä voidaan käyttää luotettavasti ja tehokkaasti useita eri solutyyppisiä joko sytoB:n kanssa tai ilman sitä. Erilaisten jyrsijäsolulinjojen (CHO, V79, CHL/IU ja L5178Y) ja ihmisestä saatujen lymfotsyyttien käytön soveltuvuudesta MNvit-määrittämismenetelmään on saatu kattavia todisteita (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Näitä ovat etenkin Société Française de Toxicologie Génétique -järjestön (SFTG) koordinoimat kansainväliset validointitutkimukset (18) (19) (20) (21) (22) sekä genotoksisuuden testausta käsittelevän kansainvälisen työryhmän (International Workshop on Genotoxicity Testing) selvitykset (4) (16). Saatavilla olevat tiedot on myös arvioitu uudelleen Euroopan komission alaisen Euroopan vaihtoehtoisten menetelmien validointikeskuksen (ECVAM) tekemässä todistusnäytön jälkivalidointitutkimuksessa, ja ECVAM:in tieteellinen neuvoa-antava komitea (ESAC) on vahvistanut testimenetelmän tieteellisesti päteväksi (32) (33) (34). Menetelmässä kuvataan ihmisen lymfoblasti-TK6-solulinjan (35), HepG2-solujen (36) (37) ja syyrianhamsterialkion primaarisolujen (38) käyttöä, vaikka niitä ei ole käytetty validointitutkimuksissa.

MÄÄRITELMÄT

6. Sovellettavat määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

JOHDANTO

7. *In vitro* -testit edellyttävät yleensä eksogeenista metabolista aktivaatiojärjestelmää, ellei solujen metabolia sovellu kyseisten aineiden testaamiseen. Eksogeeninen metabolinen aktivaatiojärjestelmä ei täysin jäljittele *in vivo* -olosuhteita. On myös vältettävä olosuhteita, joissa väärit positiiviset tulokset eivät heijasta luontaista mutageenisuutta, vaan voivat johtua esimerkiksi pH-arvon tai osmolaliteetin huomattavasta muutoksesta tai sytotoksisuuden korkeasta tasosta (39) (40) (41). Jos testikemikaali aiheuttaa viljelyaineen pH-arvon muuttumisen lisäämishetkellä, pH-arvoa on mukautettava mielellään siten, että kantaliuosta puskuroidaan niin, että kaikkien testinäytteiden, myös kaikkien kontrollinäytteiden, tilavuus pysyy muuttumattomana.
8. Mikrotumien muodostumisen analysoimiseksi on tärkeää, että sekä käsitellyissä että käsittelemättömissä viljelmissä on tapahtunut mitosi. Eniten tietoja mikrotumien laskemiseksi saadaan soluista, joissa on tapahtunut yksi mitosi testiaineella käsitellyn aikana tai sen jälkeen.

TESTIN PERIAATE

9. Ihmis- tai nisäkäspäriset soluviljelmät altistetaan testiaineelle sekä eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän kanssa että ilman sitä, paitsi jos testissä käytetään soluja, joiden metaboliintikyky on riittävä. Kaikissa testeissä käytetään samanaikaisesti myös liuotinta/kantaja-ainekontrollia ja positiivisia kontrollikemikaaleja.
10. Testiaineelle altistamisen aikana tai sen jälkeen soluja kasvatetaan riittävän kauan, jotta kromosomi- tai sukkula-vauriot voivat johtaa mikrotuman muodostumiseen inferfaasisoluissa. Jotta aneuploidia muodostuisi, testiaineen olisi yleensä oltava läsnä mitosin aikana. Kerätyt ja värjätyt interfaasisolut analysoidaan mikrotumien havaitsemiseksi. Mikrotumat on laskettava pääasiassa vain niissä soluissa, joissa mitosi on päättynyt testiaineelle altistamisen aikana tai altistamisen jälkeisessä vaiheessa, jos testissä käytetään sitä. Sytokineesin inhibiittorilla käsitellyistä viljelmistä lasketaan vain kaksitumaiset solut. Jos sytokineesin inhibiittoria ei ole käytetty, on tärkeä osoittaa, että analysoiduissa soluissa on todennäköisesti tapahtunut solunjakautuminen testiaineelle altistumisen aikana tai sen jälkeen. Kaikkien menetelmissä on tärkeä osoittaa, että solut ovat lisääntyneet sekä kontrolliviljelmässä että käsitellyissä viljelmissä, ja testiaineen aiheuttamaa sytotoksisuutta tai sytostaasia on arvioitava niissä viljelmissä (tai rinnakkaisviljelmissä), joiden mikrotumat lasketaan.

MÄÄRITYSMENETELMÄN KUVAUS

Testin valmistelu

11. Testeissä voidaan käyttää viljeltyjä ihmisen perifeerisen veren primaarisia lymfotsyyttejä (5) (19) (42) (43) ja erilaisten jyrsijäsolulinjojen (esimerkiksi CHO, V79, CHL/IU ja L5178Y) soluja (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Muiden solulinjojen ja -tyyppien käyttö on perusteltava esittäen tiedot niiden todistetusta suorituskyvystä määrittämismenetelmässä Hyväksyttävyyssperusteet -kohdan mukaisesti. Koska mikrotumien esiintymistäajuus vaikuttaa taustana määrittämismenetelmän herkkyyteen, menetelmässä olisi käytettävä solutyyppisiä, joissa mikrotumien muodostumisen taustataajuus on alhainen ja tasainen.

12. Ihmisen perifeerisen veren lymfosyytit on kerättävä nuorilta (noin 18–35-vuotiaat), terveiltä, tupakoimattomilta henkilöiltä, joiden ei tiedetä altistuneen äskettäin genotoksisille kemikaaleille tai säteilylle. Jos soluja kerätään useamalta kuin yhdeltä luovuttajalta, luovuttajien määrä on ilmoitettava. Mikrotutataajuus kasvaa iän myötä, ja ilmiö on yleisempi naisilla kuin miehillä (44). Tämä on otettava huomioon valittaessa luovuttajien soluja, jos ne on tarkoitus yhdistää.

Elatusaineet ja viljelyolosuhteet

13. Soluviljelmää on viljeltävä sopivissa elatusaineissa ja inkubaatio-olosuhteissa (kasvatusastiat, CO₂-pitoisuus, lämpötila ja kosteus). Pysyvistä solulinjoista ja kannoista on tarkistettava ajoittain modaalisen kromosomimäärän pysyvyys ja varmistettava, ettei ole mykoplasma-kontaminaatiota. Viljelmää ei pidä käyttää, jos ne ovat kontaminoituneet tai jos modaalinen kromosomimäärä on muuttunut. Normaali solusyklin kesto testauslaboratoriossa käytetyissä viljelyolosuhteissa on tunnettava. Jos menetelmänä käytetään sytokineesin estämistä, sytokineesin inhibiittorin pitoisuus on optimoitava tiettyä solutyyppejä varten, ja on osoitettava, että sillä saadaan aikaan riittävä määrä kaksitumaisia soluja pisteytystä varten.

Soluviljelmien valmistelu

14. Pysyvät solulinjat ja solukannat: solut kasvatetaan kantaviljelmistä, kylvetään elatusaineeseen sellaiseen tiheyteen, että soluviljelmät eivät saavuta konfluenttisuutta yhden solun vahvuudessa kerroksessa eivätkä kasvatusviljelmät ole liian tiheitä ennen solujen keräämisajankohtaa, ja inkuboidaan 37 °C:ssa.
15. Lymfosyytit: antikoagulantilla (esimerkiksi hepariinilla) käsiteltyä kokoverta tai erotettuja lymfosyyttejä viljellään mitogeenin (esimerkiksi fytohemagglutiniini, PHA) kanssa ennen testiaineelle ja sytoB:lle altistamista.

Metabolinen aktivaatio

16. Jos solujen endogeeninen metaboliintikyky ei ole riittävä, on käytettävä eksogeenisiä metabolisia järjestelmiä. Yleisimmin käytetty aktivaatiojärjestelmä on entsyymejä indusoivilla aineilla, kuten Aroclor 1254:llä (45) (46) tai fenobarbitonin ja β -naftoflavonin yhdistelmällä (46) (47) (48) (49) käsiteltyjen jyrsijöiden maksasta eristetty postmitokondriaalinen jae (S9), johon on lisätty kofaktoria. Jälkimmäisenä mainittu yhdistelmä ei ole ristiriidassa pysyviä orgaanisia yhdisteitä koskevan Tukholman yleissopimuksen (50) ja pysyvistä orgaanisista yhdisteistä annetun asetuksen (EY) N:o 850/2004 (66) säännösten kanssa, ja sen on osoitettu indusoivan sekaoksidaasia yhtä tehokkaasti kuin Aroclor 1254:n (46) (47) (48) (49). S9-jakeen yleisesti käytetty pitoisuusalue lopullisessa testiviljelyaineessa on 1–10 % (v/v). Metabolisen aktivaatiojärjestelmän kunto voi riippua testattavan kemikaalin luokasta, ja joissakin tapauksissa saattaa olla perusteltua käyttää useampaa kuin yhtä S9-jakeen pitoisuutta.
17. Jos käytössä on spesifisiä ihmisen tai jyrsijöiden aktivoivia entsyymejä ilmentäviä geenitekniikalla tuotettuja solulinjoja, ei eksogeenista metabolista aktivaatiojärjestelmää välttämättä tarvita, ja näitä soluja voidaan myös käyttää testisoluina. Tällaisissa tapauksissa käytettyjen solulinjojen valinta on perusteltava tieteellisesti, esimerkiksi ilmoittamalla sekaoksidaasin merkitys testiaineen (51) metabolialle ja niiden reagoivuus tunnettuihin klastogeeniin ja aneugeeneihin (katso erillinen Hyväksyttävyyssperusteet-kohta). On mahdollista, että ilmentyvä(t) sekaoksidaasi(t) ei(vät) pysty metaboloimaan testiainetta; tässä tapauksessa negatiiviset tulokset eivät osoita, että testiaineella ei voida indusoida mikrotumia.

Testiaineen valmistelu

18. Kiinteät kemikaalit on liuotettava tai sekoitettava sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja tarvittaessa laimennettava ennen solujen käsittelyä. Nestemäiset kemikaalit voidaan lisätä suoraan koejärjestelmiin ja/tai laimentaa ennen solujen käsittelyä. Kaasujen tai haituvien kemikaalien testauksessa standardimenettelyihin on tehtävä asianmukaisia mukautuksia. Kyseiset kaasut tai kemikaalit on esimerkiksi käsiteltävä suljetuissa astioissa (52) (53). Testiaine on valmistettava juuri ennen altistusta, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiileittitutkimuksilla.

Testiolosuhteet

Liuottimet/kantaja-aineet

19. Liuotin/kantaja-aine ei saisi reagoida testiaineen kanssa tai vaikuttaa solujen elinkykyyn tai S9:n aktiivisuuteen käytetyssä pitoisuudessa. Jos testissä käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita (esimerkiksi vettä, soluviljelmän elatusainetta tai dimetyylisulfoksidia), niiden käyttö on perusteltava tiedoilla, joilla osoitetaan, että ne ja testiaine sopivat yhteen ja että ne eivät ole genotoksisia. Vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista.

SytoB:n käyttö sytokineesin inhibiittorina

20. Yhtenä MNvit-määrittämenetelmän tärkeimpänä näkökohtana on varmistaa, että lasketuissa soluissa on tapahtunut mitosi käsittelyn aikana tai käsittelyä seuraavalla inkubaatiojaksolla, jos sitä on käytetty. Sytokineesin inhibiittorina käytetään yleisimmin sytoB:tä, koska se estää aktiinin muodostumisen ja näin ollen estää tytarsolujen erkaantumisen mitosisin jälkeen, mikä johtaa kaksitumaisten solujen muodostumiseen (5) (54) (55). Tämän ansiosta mikrotumien laskeminen voidaan rajoittaa soluihin, joissa on tapahtunut mitosi käsittelyn aikana tai sen jälkeen. Testiaineen vaikutus solujen proliferaation kinetiikkaan voidaan mitata samanaikaisesti. Ihmisen lymfosittejä käytettäessä sytokineesin inhibiittorina on käytettävä sytoB:tä, koska solusyklin kesto vaihtelee eri viljelmien ja luovuttajien välillä ja koska kaikki lymfositit eivät reagoi PHA:han. Solulinjojen testauksessa on käytetty myös muita menetelmiä sen määrittämiseksi, ovatko laskettavat solut jakautuneet; näitä menetelmiä tarkastellaan jäljempänä (katso 26 kohta).

21. Laboratorion on määritettävä sopiva sytoB:n pitoisuus erikseen kullekin solutyypille, jotta liuottimella/kantaja-aineella käsiteltyjen kontrolliviljelmien kaksitumaisten solujen määrä voidaan optimoida. Yleensä sytoB:n sopiva pitoisuus on 3–6 µg/ml.

Solujen proliferaation ja sytotoksisuuden mittaaminen ja altistuspitoisuuksien valitseminen

22. Päätettäessä suurimmasta testattavasta pitoisuudesta on vältettävä pitoisuuksia, jotka voivat aiheuttaa vääriä positiivisia vasteita, kuten liian voimakasta sytotoksisuutta, saostumista väliaineeseen tai pH-arvon tai osmolaliteetin merkittävää muuttumista (39) (40) (41).

23. Solujen proliferaation mittauksella varmistetaan, että käsitellyissä soluissa on tapahtunut mitosi määrittämenetelmän aikana ja että käsitellyissä on käytetty asianmukaisia sytotoksisuustasoja (katso 29 kohta). Sytotoksisuus on määritettävä metabolisen aktivaation avulla ja ilman sitä soluissa, joissa metabolinen aktivaatio on tarpeen, tarkastelemalla solumäärän suhteellista lisääntymistä tai populaation suhteellista kaksinkertaistumista (katso kaavat lisäyksessä 2), paitsi jos käytetään sytoB:tä. Jos sytoB:tä käytetään, sytotoksisuus voidaan määrittää käyttämällä replikaatioindeksiä (RI) (katso kaava lisäyksessä 2).

24. Kun viljelmät käsitellään sytoB:llä ja viljelmän yksitumaisten, kaksitumaisten ja monitumaisten solujen suhteellinen osuus määritetään, käsittelyn täsmällinen vaikutus solujen proliferaatioon ja solun sytotoksiseen tai sytostaattiseen toimintaan voidaan määrittää kvantitatiivisesti (5). Lisäksi varmistetaan, että laskennassa huomioon otetaan vain solut, jotka ovat jakautuneet käsittelyn aikana tai sen jälkeen.

25. SytoB:llä tehtävissä tutkimuksissa sytostaasi/sytotoksisuus voidaan kvantifioida sytokineesin eston jälkeisestä proliferaatioindeksistä (5) (26) (56) tai se voidaan johtaa RI:stä, joka on määritetty vähintään 500 solulle viljelmää kohti (katso kaavat lisäyksessä 2). Kun solujen proliferaatiota arvioidaan sytoB:n avulla, sytokineesin eston proliferaatioindeksi tai RI on määritettävä tarkastelemalla vähintään 500:aa solua viljelmää kohti. Sytotoksisuus voidaan arvioida muun muassa näiden tulosten avulla vertailemalla käsiteltyjen viljelmien ja kontrolliviljelmien arvoja. Myös muiden sytotoksisuuden merkkien (esimerkiksi konfluenttisuuden, solujen määrän, apoptoosin, nekroosin ja metafaasien määrän) arvioinnilla voidaan saada hyödyllistä tietoa.

26. Ilman sytoB:tä tehtävissä tutkimuksissa on osoitettava, että viljelmässä lasketut solut ovat jakautuneet testiaineella käsittelyn aikana tai sen jälkeen. Muussa tapauksessa tutkimuksesta voidaan saada vääriä negatiivisia tuloksia. Menetelmiä, joilla varmistetaan, että jakautuneet solut tulevat lasketuiksi, ovat muun muassa bromodeoksiuridiinin (BrdU) inkorporoituminen ja sen osoittaminen myöhemmin jakautuneiden solujen tunnistamiseksi (57), kloonien muodostuminen, kun pysyvien solulinjojen soluja käsitellään ja lasketaan *in situ* mikroskooppilevyllä (proliferaatioindeksi (PI)) (25) (26) (27) (28), tai populaation suhteellisen kaksinkertaistumisen tai solumäärän suhteellisen lisääntymisen määrittäminen tai muu soveltuva osoitettu menetelmä (16) (56) (58) (59) (katso kaavat lisäyksessä 2). Myös muiden sytotoksisuuden tai sytostaasin merkkien (esimerkiksi konfluenttisuuden, solujen määrän, apoptoosin, nekroosin ja metafaasien määrän) arvioinnilla voidaan saada hyödyllistä tietoa.

27. Vähintään kolmea analysoitavissa olevaa testipitoisuutta on arvioitava. Jotta tämä olisi mahdollista, kokeessa voidaan käyttää useampia, toisistaan vain hieman poikkeavia pitoisuuksia. Mikrotumien muodostuminen voidaan arvioida niissä pitoisuuksissa, joiden sytotoksisuus on asianmukaisella vaihteluvälillä. Vaihtoehtoisesti voidaan suorittaa alustava sytotoksisuustesti, jolla rajataan lopullisen testin vaihteluväliä.

28. Suurimmassa pitoisuudessa sytotoksisuuden on oltava $55 \pm 5\%$. Sitä korkeammilla tasoilla kromosomit voivat vaurioitua sytotoksisuuden sekundaarivaikutuksena (60). Jos sytotoksisuutta esiintyy, valittujen testipitoisuuksien on katettava vaihteluväli 55 ± 5 prosentin sytotoksisuudesta vähäiseen sytotoksisuuteen tai tasoon, jolla sytotoksisuutta ei esiinny lainkaan.

29. Jos sytotoksisuutta tai saostumista ei esiinny, suurimman testipitoisuuden on vastattava tasoa 0,01 M, 5 mg/ml tai 5 µl/ml sen mukaan, mikä pitoisuuksista on pienin. Analysoitavaksi valittujen pitoisuuksien on pääsääntöisesti erottava toisistaan enintään 10-kertaisesti. Jos testiaineen pitoisuus-vastekäyrä on jyrkkä, testiaineiden pitoisuudet voivat tarvittaessa olla lähempänä toisiaan, jotta myös keskitason ja vähäisen toksisuustason viljelmät pisteytetään.
30. Jos liukoisuus on rajoittava tekijä, suurimman pitoisuuden – jos sitä ei ole rajoitettu sytotoksisuuden takia – on oltava se pienin pitoisuus, jossa viljelmissä esiintyy mahdollisimman vähäistä saostumista; saostuminen ei kuitenkaan saa vaikuttaa laskemiseen. Saostumisen arvioinnissa on käytettävä esimerkiksi valomikroskooppia, jotta voidaan havaita viljelyn aikana esiintyvä tai (käsittelyn loppuun mennessä) muodostuva saostuma.

Kontrollit

31. Jokaisessa kokeessa on käytettävä samanaikaisia positiivisia kontrolleja ja liuotin-/kantaja-ainekontrolleja metabolisen aktivaation läsnä ollessa ja ilman sitä.
32. Positiivisia kontrolliaineita tarvitaan, jotta voidaan osoittaa käytettyjen solujen – ja testisuunnitelman – kyky tunnistaa klastogeneenejä ja aneugeenejä sekä vahvistaa S9-preparaatin metaboloitokyky. Positiivisia kontrollikemikaaleina on käytettävä tunnettuja mikrotumien indusioijia pitoisuuksina, joiden voidaan odottaa aiheuttavan vähäisen mutta toistettavissa olevan lisääntymisen taustaan verrattuna ja osoittaa koejärjestelmän herkkyyden. Positiivisen kontrollikemikaalin pitoisuudet on valittava siten, että vaikutukset ovat selvät mutta eivät paljasta heti lukijalle koodattujen objektilasien identiteettiä.
33. Soluviljelmän metaboloitokyky ja klastogeenien osoituskyky on osoitettava käyttämällä metabolista aktivaatiota edellyttävää klastogeenia (esimerkiksi syklofosfamidi tai bentso[a]pyreeni). Muita positiivisia kontrollikemikaaleja voidaan käyttää, jos käyttö perustellaan. Koska tietyt metabolista aktivaatiota edellyttävät positiiviset kontrollikemikaalit voivat tietyissä käsittelyolosuhteissa tai tietyissä solulinjoissa aktivoitua ilman eksogeenista metabolista aktivaatiota, metabolisen aktivaation tarve ja S9-preparaatin toiminta on testattava valitussa solulinjassa ja valituissa pitoisuuksissa.
34. Tähän mennessä ei ole havaittu, että yhdenkään aneugeenin genotoksinen toiminta edellyttäisi metabolista aktivaatiota (16). Nykyisin aneugeenisen toiminnan hyväksytyjä positiivisia kontrollikemikaaleja ovat esimerkiksi kolksiini ja vinblastiini. Myös muiden kemikaalien käyttö on sallittu, jos ne indusoivat mikrotumia yksinomaan tai pääasiassa aneugeenisen toiminnan välityksellä. Jotta ei tarvittaisi kahta positiivista kontrollikemikaalia erikseen klastogeenisuutta ja aneugeenisuutta varten (ilman metabolista aktivaatiota), aneugeenisuuden kontrollikemikaalia voidaan käyttää positiivisena kontrollikemikaalina ilman S9-jaetta ja käytetyn metabolisen aktivaatiojärjestelmän riittävyys voidaan testata klastogeenisuuden kontrollikemikaalilla. Sekä klastogeenisuuden että aneugeenisuuden positiivista kontrollikemikaalia on käytettävä soluissa, joissa ei tarvita S9-jaetta. Ehdotetut positiiviset kontrollikemikaalit esitetään lisäyksessä 3.
35. Samaan kemiallisten aineiden ryhmään kuuluvan positiivisen kontrollikemikaalin käyttöä voidaan harkita, mikäli sopivia kemikaaleja on saatavilla. Positiivisia kontrollikemikaaleja on käytettävä vain, jos ne soveltuvat kyseiselle solutyypille ja kyseisiin aktivaatio-olosuhteisiin.
36. Solujen jokaisena keräämisajankohtana on otettava näytteet myös liuottimella/kantaja-aineella käsitellyistä kontroleista. Lisäksi on käytettävä myös käsittelemättömiä negatiivisia kontrolleja (ei liuotinta/kantaja-ainetta), paitsi jos julkaistut tai laboratorion aikaisemmat tiedot kontrolleista osoittavat, ettei valitulla liuottimella ole käytetyissä pitoisuuksissa genotoksista tai muita haitallisia vaikutuksia.

TESTIMENETTELY

Käsittelyaikataulu

37. Jotta aneugeenin tai klastogeenin toiminta tietyssä solusyklin vaiheessa voidaan mahdollisimman todennäköisesti osoittaa, on tärkeää, että testiaineella käsitellään riittävä määrä soluja niiden kaikissa solusyklin vaiheissa. Solulinjojen ja primääristen soluviljelmien käsittelyaikataulu voi näin ollen poiketa jonkin verran lymfosyyttien käsittelyaikataulusta, sillä niiden solusyklin käynnistyminen edellyttää mitogeenista stimulaatiota. Niitä tarkastellaan 41–43 kohdassa (16).
38. Teorian ja julkaistujen tietojen perusteella (18) useimmat aneugeenit ja klastogeenit voidaan osoittaa S9-jakeen kanssa ja ilman S9-jaetta toteutettavalla 3–6 tuntia kestäväällä lyhyellä käsittelyajaksolla, jonka jälkeen testiaine poistetaan ja viljelmän annetaan kasvaa 1,5–2,0 solusyklin ajan (6). Solut kerätään noin 1,5–2,0 normaalin (eli käsittelemättömän) solusyklin kuluttua joko käsittelyn aloittamisen jälkeen tai sen lopussa (katso taulukko 1). Näytteenotto- tai palautumisaikoja voidaan pidentää, jos tiedetään tai oletetaan, että testiaine vaikuttaa solusyklin kestoon (esimerkiksi kun testataan nukleosidianalogeja).

39. Koska S9-preparaatit voivat olla toksisia viljellylle nisäkässoluille, pidennettyä 1,5–2,0 normaalin solusyklin altistusta käytetään vain ilman S9-aietta. Pidennetyssä käsittelyssä soluja voidaan käsitellä testikemikaalilla joko sytoB:n kanssa tai ilman sitä. Näin voidaan ottaa huomioon testiaineen ja sytoB:n mahdollinen vuorovaikutus.
40. Solujen ehdotetut käsittelyaikataulut esitetään taulukossa 1. Näitä yleisiä käsittelyaikatauluja voidaan mukauttaa testiaineen stabiiliuden tai reaktiivisuuden tai käytettävien solujen erityisten kasvuominaisuuksien mukaisesti. Kaikki käsittelyt on käynnistettävä ja saatava päätökseen, kun solut kasvavat eksponentiaalisesti. Aikataulut esitellään yksityiskohtaisemmin jäljempänä olevissa 41–47 kohdassa.

Taulukko 1

Solujen käsittely- ja keräämisajankohdat MNvit-määrittämenetelmässä

Lymfosyytit, primaarisolut ja solulinjat, jotka on käsitelty sytoB:llä	+ S9	Käsitellään 3–6 tuntia S9:n kanssa; poistetaan S9 ja käsittelyväliaine; lisätään uusi väliaine ja sytoB; kerätään 1,5–2,0 normaalia solusykliä myöhemmin.
	– S9 Lyhyt altistus	Käsitellään 3–6 tuntia; poistetaan käsittelyväliaine; lisätään uusi väliaine ja sytoB; kerätään 1,5–2,0 normaalia solusykliä myöhemmin.
	– S9 Pidennetty altistus	<i>Vaihtoehto A:</i> Käsitellään 1,5–2 normaalin solusyklin ajan sytoB:n kanssa; kerätään altistusjakson päättyessä. <i>Vaihtoehto B:</i> Käsitellään 1,5–2,0 normaalin solusyklin ajan; poistetaan testiaine; lisätään uusi väliaine ja sytoB; kerätään 1,5–2,0 normaalia solusykliä myöhemmin.

Solulinjat, joita ei ole käsitelty sytoB:n kanssa
(Samat käsittelyaikataulut, mutta sytoB:tä ei lisätä)

Lymfosyytit, primaarisolut ja solulinjat sytoB:n kanssa

41. Tehokkain menetelmä lymfosyyteille on aloittaa testiaineelle altistaminen 44–48 tunnin kuluttua PHA-stimulaatiosta, kun syklin synkronoitumista ei enää havaita (5). Solut käsitellään ensin testiaineella 3–6 tunnin ajan sekä S9:n läsnä ollessa että ilman sitä. Käsittelyväliaine poistetaan ja lisätään uutta väliainetta, joka sisältää sytoB:tä, ja solut kerätään 1,5–2,0 normaalia solusykliä myöhemmin.
42. Jos näistä lyhyistä (3–6 tunnin) käsittelyistä saadaan negatiiviset tai epäselvät tulokset, soluja altistetaan uudelleen kauemmin kestäväälle käsittelylle ilman S9:ää. On olemassa kaksi yhtä hyvää käsittelyvaihtoehtoa. Stimuloituille lymfosyyteille voi kuitenkin olla parempi käyttää vaihtoehtoa A, joilla eksponentiaalinen kasvu voi hidastua 96 tunnin kuluttua stimulaatiosta. Soluviljelmät eivät myöskään saa olla konfluentteja vaihtoehdon B viimeiseen näytteenottoajankohtaan mennessä.
- Vaihtoehto A: Soluja käsitellään testiaineella 1,5–2,0 normaalin solusyklin ajan, ja ne kerätään käsittelyjakson päättyessä.
- Vaihtoehto B: Soluja käsitellään testiaineella 1,5–2,0 normaalin solusyklin ajan. Käsittelyväliaine poistetaan ja korvataan uudella väliaineella, ja solut kerätään seuraavan 1,5–2,0 normaalin solusyklin jälkeen.
43. Primaarisolut ja solulinjoja on käsiteltävä samalla tavalla kuin lymfosyyttejä, mutta niitä ei tarvitse stimuloida PHA:lla 44–48 tunnin ajan. Kun kyseessä ovat muut solut kuin lymfosyytit, niitä on altistettava niin, että tutkimuksen päättymisajankohtana solut ovat edelleen kasvun logaritmisessa vaiheessa.

Solulinjat ilman sytoB:tä

44. Soluja on käsiteltävä 3–6 tunnin ajan S9:n läsnä ollessa ja ilman sitä. Käsittelyväliaine poistetaan ja korvataan uudella väliaineella, ja solut kerätään 1,5–2,0 normaalia solusykliä myöhemmin.
45. Jos molemmista lyhyistä (3–6 tunnin) käsittelyistä saadaan negatiiviset tai epäselvät tulokset, soluja altistetaan uudelleen pidennetylle käsittelylle (ilman S9:ää). Käytettävissä on kaksi yhtä hyvää käsittelyvaihtoehtoa:
- Vaihtoehto A: Soluja käsitellään testiaineella 1,5–2,0 normaalin solusyklin ajan, ja ne kerätään käsittelyjakson päättyessä.
 - Vaihtoehto B: Soluja käsitellään testiaineella 1,5–2,0 normaalin solusyklin ajan. Käsittelyväliaine poistetaan ja korvataan uudella väliaineella, ja solut kerätään seuraavan 1,5–2,0 normaalin solusyklin jälkeen.
46. Yhden solun vahvuisissa kerroksissa voi esiintyä mitosisissa olevia soluja (pyöreitä, irtoavat pinnasta) 3–6 tuntia kestävästä käsittelystä päättyessä. Koska mitosisissa olevat solut irtoavat helposti, ne voivat hävitä väliaineen mukana, kun se kaadetaan pois. Nämä solut on kerättävä huolellisesti viljelmien huuhtelun yhteydessä ja palautettava viljelmiin, jotta mitosisivaiheessa olevia soluja, joissa mikrotumia voi muodostua, ei menetetä keruuvaiheessa.

Viljelmien määrä

47. Testiaineen jokaista pitoisuutta sekä kantaja-aine-/liuotinkontrollia ja negatiivista kontrollia varten on käytettävä kaksi rinnakkaisviljelmää. Mikäli laboratorion aikaisemmat tutkimustulokset osoittavat, että rinnakkaisviljelmien välillä on vain hyvin vähäisiä eroja, yhden viljelmän käyttö voi olla hyväksyttävää. Yhtä viljelmää käytettäessä suositellaan, että pitoisuuksia analysoidaan tavallista suurempi määrä.

Solujen kerääminen ja objektilasien preparointi

48. Jokainen viljelmiä kerätään ja käsitellään erikseen. Solujen preparointiin voidaan käyttää hypotonista käsittelyä, mutta tämä vaihe ei ole tarpeen, jos solut levittäytyvät lasille riittävästi. Objektilasien preparoinnissa voidaan käyttää erilaisia tekniikoita edellyttäen, että pisteytystä varten saadaan korkealaatuisia solupreparaatteja. Solulima on säilytettävä mikrotumien osoittamista ja (sytokineesin estämiseen perustuvassa menetelmässä) kaksitumaisten solujen luotettavaa tunnistamista varten.
49. Objektilasit voidaan värjätä erilaisilla menetelmillä, kuten Giemsa-menetelmällä tai fluorisoivilla DNA-spesifisillä väriaineilla (59). DNA-spesifisen väriaineen (esimerkiksi akridiinioranssin (61) tai Hoechst 33258:n plus pyroniini-Y:n (62)) käytöllä voidaan eliminoida joitakin ei-DNA-spesifisen väriaineen käyttöön liittyviä artefakteja. Mikrotumien sisällön (kromosomin/kromosomifragmentin) selvittämisessä voidaan käyttää anti-kinetokorivasta-aineita, FISH-tekniikkaa yhdessä pansentromeeri-DNA-koettimien kanssa tai *in situ* -merkkauksella pansentromeerispesifisillä alukkeilla yhdessä sopivan DNA:n vastavärjäyksen kanssa, jos mikrotumien muodostumisesta halutaan saada mekanistista tietoa (15) (16). Muita klastogeenien ja aneugeenien erottelumenetelmiä voidaan käyttää, jos menetelmät on osoitettu tehokkaiksi.

Analyysi

50. Kaikki objektilasit, myös positiivisia ja negatiivisia kontrolleja sisältävät, on koodattava ennen mikroskooppitutkimusta. Koodattuja näytteitä voidaan analysoida myös validoidulla, automaattisella virtausmittauksella- tai kuva-analysijärjestelmällä.
51. SytoB-käsittelyjen viljelmien mikrotumien määrä on analysoitava vähintään 2 000 kaksitumaisessa solussa kutakin pitoisuutta kohti (vähintään 1 000 kaksitumaista solua viljelmää kohti; kaksi viljelmää pitoisuutta kohti). Jos käytetään yhtä erillistä viljelmää, viljelmästä on laskettava vähintään 2 000 kaksitumaista solua pitoisuutta kohti. Jos kussakin pitoisuudessa laskettavissa on huomattavasti vähemmän kuin 1 000 kaksitumaista solua viljelmää kohti (tai 2 000 solua, jos käytetään yhtä viljelmää) ja jos mikrotumien määrä ei havaintojen mukaan ole kasvanut merkittävästi, testi on toistettava useammilla soluilla tai vähätoisemmilla pitoisuuksilla sen mukaisesti, kumpi vaihtoehto soveltuu tarkoitukseen paremmin. On varmistettava, että muodoltaan epäsuunnollisia kaksitumaisia soluja tai soluja, joiden kaksi tumaa poikkeaa kooltaan huomattavasti toisistaan, ei lasketa; kaksitumaisia soluja ei myöskään saa sekoittaa huonosti levittyneisiin monitumaisiin soluihin. Useampia kuin kaksi päätumaa sisältävistä soluista ei pitäisi analysoida mikrotumia, koska mikrotumien määrä voi olla tällaisissa soluissa suurempi (63) (64). Yksitumaisten solujen laskeminen hyväksytään, jos testiaineen on osoitettu häiritsevän sytoB:n aktiivisuutta.

52. Solulinjoissa, joilla tehdään määritys ilman sytoB-käsittelyä, mikrotumat olisi pisteytettävä vähintään 2 000 solussa pitoisuutta kohti (vähintään 1 000 solua viljelmää kohti; kaksi viljelmää pitoisuutta kohti). Jos yhtä pitoisuutta kohti käytetään vain yhtä viljelmää, kyseisestä viljelmästä on laskettava vähintään 2 000 solua.
53. Kun sytoB:tä käytetään, sytokineesin eston proliferaatioindeksi tai RI on määritettävä solujen proliferaation arvioimiseksi (katso lisäys 2) käyttämällä vähintään 500:aa solua viljelmää kohti. Kun käsittely tehdään ilman sytoB:tä, on tärkeää esittää todisteet siitä, että laskettavat solut ovat proliferoituneet (ks. 24–27 kohta).

Hyväksyttävyyssperusteet

54. Tässä kuvatun MNvit-määritysmenetelmän käyttöä ehdottavan laboratorion on osoitettava valmiutensa osoittaa luotettavasti ja täsmällisesti kemikaalit, jotka tunnetusti toimivat aneugeenisesti ja klastogeenisesti metabolisen aktivaation läsnä ollessa ja ilman sitä, sekä tunnetut negatiiviset kemikaalit. Tässä on käytettävä lisäyksessä 3 lueteltuja vertailukemikaaleja. Laboratorio voi osoittaa valmiutensa käyttää tätä testimenetelmää asianmukaisesti esittämällä todisteet siitä, että mikrotumien muodostumisen pisteytykseen käytetyissä soluissa on tapahtunut yksi tuman jakautuminen, jos testi tehdään ilman sytoB:tä.
55. Vertailukemikaaleina käytettäväksi suositellaan lisäyksessä 3 lueteltuja kemikaaleja. Korvaavia tai täydentäviä kemikaaleja voidaan käyttää, jos niiden vaikutus tunnetaan, jos ne indusoivat mikrotumia samoilla toimintamekanismeilla ja jos ne on osoitettu merkitykselliseksi MNvit-menetelmällä testattavien kemikaalien suhteen. Perusteluna voidaan esittää muun muassa validointitutkimusta, jossa testiaineen kemikaaliluokan tai tutkitavan vauriomekanismin perusteella on käytetty useita eri aineita tai vähäisempää ainemäärää.
56. Liuotin-/kantaja-ainekontrollien ja käsittelemättömien viljelmien olisi annettava tulokseksi toistettavasti vähäinen ja yhdenmukainen mikrotumien määrä (yleensä 5–25 mikrotumaa tuhatta solua kohti 11 kohdassa mainittujen solutyypin osalta). Muiden solutyypin tuotosten vaihteluvälit voivat olla erilaisia, ja ne on määritettävä, kun solutyyppejä validoidaan MNvit-määritysmenetelmässä käyttämistä varten. Kontrollien vaihteluvälit on määritettävä pitkältä ajalta negatiivisista kontrolleista, liuotinkontrolleista ja positiivisista kontrolleista saatujen tietojen perusteella. Näitä arvoja olisi käytettävä arvioitaessa, ovatko samanaikaiset negatiiviset tai positiiviset kontrollit asianmukaisia.
57. Jos määritysmenetelmän tutkimussuunnitelmaan ehdotetaan pieniä muutoksia (esimerkiksi automaattisten pisteytystekniikoiden käyttämistä manuaalisten laskentatekniikoiden asemesta tai uuden solutyypin käyttämistä), muutoksen vaikutus on osoitettava, ennen kuin tutkimussuunnitelman muutos voidaan hyväksyä. Vaikutuksen osoittamisella tarkoitetaan, että on muun muassa osoitettava, että kromosomin katkeamisen, liittymän tai häviämisen tärkeimmät mekanismit voidaan osoittaa ja että testattavan yksittäisen aineen luokalle tai monille erilaisille aineille voidaan saada asianmukaiset positiiviset ja negatiiviset tulokset.

MITTAUSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

Tulosten käsittely

58. Jos käytetään sytokineesin inhibiittoritekniikkaa, mikrotumien indusoitumisen arvioinnissa käytetään vain sellaisia kaksitumaisia soluja, joissa esiintyy mikrotumia (riippumatta mikrotumien määrästä solua kohti). Yksi, kaksi tai monta mikrotumaa omaavien solujen määrän laskemisella voidaan saada hyödyllistä tietoa, mutta se ei ole pakollista.
59. Kaikille käsitellyille viljelmille ja liuotin-/kantajakontrolleille olisi tehtävä samanaikaisesti sytotoksisuus- ja/tai sytostaasimääritykset (58). Sytokineesin eston proliferaatioindeksi tai RI on laskettava kaikille käsitellyille viljelmille ja kontrolliviljelmille määrittämällä solusyklin viivästymisen, kun käytetään sytokineesin estomenetelmää. Jos sytoB:tä ei käytetä, on määritettävä populaation suhteellinen kaksinkertaistuminen, solumäärän suhteellisen lisääntyminen tai PI (katso lisäys 2).
60. Kustakin viljelmästä on esitettävä tiedot erikseen. Kaikista tiedoista on lisäksi esitettävä yhteenveto taulukkomuodossa.
61. MNvit-määritysmenetelmässä kemikaalit voivat aiheuttaa mikrotumien muodostumista indusoimalla kromosomien katkeamista, niiden häviämistä tai molempia. Antikinetokorivasta-aineilla, sentromeerispesifisillä *in situ*-koettimilla tai muilla menetelmillä voidaan yrittää määrittää, johtuuko mikrotumien indusoitumismekanismi klastogeenisesta ja/tai aneugeenisesta vaikutuksesta.

Tulosten arviointi ja tulkinta

62. Selviä positiivisia tai negatiivisia tuloksia ei tarvitse vahvistaa täydentävillä testeillä. Epäselviä tuloksia voidaan selvittää analysoimalla vielä tuhat solua kaikista viljelmistä, jotta vältetään satunnaisuuden vääristyminen. Jos tulosta ei saada selville tällä tavalla, viljelmille on tehtävä uusia testejä. Niissä olisi harkittava tutkimusparametrien muuttamista tapauksesta riippuen laajemmin tai suppeammin. Tutkimusparametreja, joita voitaisiin muuttaa, ovat muun muassa testipitoisuuksien erot, viljelmien käsittelyajankohta ja solujen keräämisajankohta ja/tai metabolisen aktivaation olosuhteet.

63. Positiivinen tulos voidaan päätellä useiden perusteiden avulla. Näitä ovat esimerkiksi mikrotumallisten solujen määrän pitoisuuteen sidottu kasvu tai tilastollisesti merkittävä kasvu. Aluksi on tarkasteltava tulosten biologista merkityksellisyyttä. Sen arvioimiseksi voidaan tarkastella sitä, ovatko havaitut arvot aiemman kontrollivaihteluvälin sisällä vai sen ulkopuolella. Testitulosten arvioinnissa voidaan käyttää asianmukaisia tilastollisia menetelmiä (65). Tilastollisen testauksen tuloksia on kuitenkin arvioitava suhteessa annos-vastesuhteeseen. Myös uusittavuus ja aiemmat tulokset on otettava huomioon.
64. Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin tapauksissa mittaustulosten pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä testiaineen aktiivisuudesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi kokeen toistokertojen määrästä riippumatta.
65. MNvit-määrittämenetelmässä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että testiaine indusoi kromosomien katkeamista tai häviämää viljellyissä nisäkässoluissa. Negatiiviset tulokset osoittavat, että testiaine ei käytetyissä testiolosuhteissa indusoi kromosomien katkeamista ja/tai liittymää tai häviämää viljellyissä nisäkässoluissa.

Testiraportti

66. Testiraportissa on annettava vähintään seuraavat tiedot, jos ne ovat merkityksellisiä tutkimuksen suorituksen kannalta:

Testikemikaali

- tunnistetiedot sekä CAS-numero ja EC-numero
- fysikaalinen olomuoto ja puhtaus
- tutkimuksen tekemisen kannalta merkitykselliset fysikaaliskemialliset ominaisuudet
- testikemikaalin reagointi liuottimen/kantaja-aineen tai solujen kasvatusväliaineen kanssa

Liuotin/kantaja-aine

- liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet
- testiaineen liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa

Solut

- käytettyjen solujen tyyppi ja alkuperä
- käytetyn solutyypin soveltuvuus
- mahdollinen mykoplasma kontaminaatio
- tiedot solusyklin kestosta, jakautumisaika tai proliferaatioindeksi
- lymfositien osalta verenluovuttajien sukupuoli, ikä ja tarvittaessa määrä
- lymfositien osalta tieto siitä, onko testissä altistettu kokoverta vai eristettyjä lymfosittejä
- tarvittaessa siirrostusten lukumäärä
- tarvittaessa soluviljelymenetelmät
- kromosomien modaalinen lukumäärä
- tavallinen (negatiivisen kontrollin) solusyklin kesto

Testiolosuhteet

- mahdollinen sytokineesin inhibiittori (esimerkiksi sytoB), sen pitoisuus ja solujen altistuksen kesto
- pitoisuuksien ja soluviljelmien lukumäärän valintaperusteet, joihin sisältyvät esimerkiksi sytotoksisuustiedot ja liukoisuusrajat, mikäli tiedot ovat käytettävissä

- väliaineen koostumus ja tarvittaessa CO₂-pitoisuus
- testiaineen pitoisuudet
- lisätyn kantaja-aineen ja testiaineen pitoisuus (ja/tai tilavuus)
- inkubaatiolämpötila ja -aika
- käsittelyn kesto
- käsittelyn jälkeinen keräämisajankohta
- tarvittaessa solutiheys inokuloitaessa
- metabolisen aktivaatiojärjestelmän tyyppi ja koostumus, myös sen hyväksyttävyyssperusteet
- positiiviset kontrollikemikaalit ja negatiiviset kontrollit
- objektilasien preparointimenetelmät ja käytetyt värjäystekniikat
- mikrotumien tunnistusperusteet
- analysoitujen solujen määrät
- sytotoksisuuden mittaamenetelmät
- muut sytotoksisuuteen liittyvät tiedot
- tutkimusten positiivisuuden, negatiivisuuden tai epäselvyyden arviointiperusteet
- käytetyt tilastoanalyysimenetelmät
- tarvittaessa menetelmät sen määrittämiseksi, sisältävätkö mikrotumat kokonaisia kromosomeja vai kromosomifragmentteja, esimerkiksi kinetokorivasta-aineen käyttö

Tulokset

- käytetyt sytotoksisuuden määritysmenetelmät, esimerkiksi sytokineesin eston proliferaatioindeksi tai RI (sytokineesin estoon perustuva menetelmä); solumäärän suhteellinen lisääntyminen, populaation suhteellinen kaksinkertaistuminen tai PI (muu kuin sytokineesin estoon perustuva menetelmä); tarvittaessa muut havainnot, esimerkiksi solujen konfluenssi, apoptoosi, nekroosi, metafaasien määrä ja kaksitumaisten solujen määrä
- saostumisen merkit
- tiedot käsittelyväliaineen pH:sta ja osmolaliteetista, jos määritetty
- analysoitavaksi hyväksyttävien solujen määritelmä
- yksi-, kaksi- ja monitumaisten solujen osuudet, jos sytokineesin estoon perustuvaa menetelmää on käytetty
- mikrotumallisten solujen määrä kussakin käsitellyssä viljelmässä ja kontrolliviljelmässä ja tiedot solujen mahdollisesta kaksitumaisuudesta tai monitumaisuudesta
- pitoisuus-vastesuhde, jos mahdollista
- samanaikaisten negatiivisten (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisten kontrollikemikaalien tiedot (pitoisuudet ja luottimet)
- aikaisemmat tiedot negatiivisista (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisista kontrollikemikaaleista, myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat sekä luottamusväli (esimerkiksi 95 prosenttia)
- tilastoanalyysi; mahdolliset p-arvot

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDELUETTELO

- (1) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.* 392, s. 1–4.
- (2) Parry, J. M. ja Sors, A. (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Res.* 287, s. 3–15.
- (3) Fenech, M. ja Morley, A. A. (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios.* 43, s. 233–246.
- (4) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. ja Wakata, A. (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, s. 167–172.
- (5) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay. *Nature Protocols* 2(5), s. 1084–1104.
- (6) Fenech, M. ja Morley, A. A. (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Res.* 161, s. 193–198.
- (7) Eastmond, D. A. ja Tucker, J. D. (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ. Mol. Mutagen.* 13, s. 34–43.
- (8) Eastmond, D. A. ja Pinkel, D. (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes. *Mutation Res.* 234, s. 9–20.
- (9) Miller, B. M., Zitzelsberger, H. F., Weier, H. U. ja Adler, I. D. (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis* 6, s. 297–302.
- (10) Farooqi, Z., Darroudi, F. ja Natarajan, A. T. (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis* 8, s. 329–334.
- (11) Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. ja Lo Jacono, F. (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Res.* 319, s. 205–213.
- (12) Norppa, H., Renzi, L. ja Lindholm, C. (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis* 8, s. 519–525.
- (13) Eastmond, D. A., Rupa, D. S. ja Hasegawa, L. S. (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Res.* 322, s. 9–20.
- (14) Marshall, R. R., Murphy, M., Kirkland, D. J. ja Bentley, K. S. (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Res.* 372, s. 233–245.
- (15) Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. ja Crebelli, R. (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Res.* 372, s. 211–219.
- (16) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. ja Wakata, A. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.* 540, s. 153–163.
- (17) OECD (1997). *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*, Test Guideline No. 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa www.oecd.org/env/testguidelines

- (18) Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M. J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon, G. ja Marzin, D. (2006). SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Res.* 607, s. 13–36.
- (19) Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L. C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. ja Lorge, E. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Res.* 607, s. 37–60.
- (20) Aardema, M. J., Snyder, R. D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R. J., Gibson, D. P., Soelter, S., Curry, P. T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. ja Lorge, E. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Res.* 607, s. 61–87.
- (21) Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senjyu, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. ja Lorge, E. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Res.* 607, s. 88–124.
- (22) Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldeldkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. ja Lorge, E. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Res.* 607, s. 125–152.
- (23) Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A. A. ja Locher, F. (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Res.* 392, s. 187–208.
- (24) Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. ja Lorge, E. (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Res.* 392, s. 45–59.
- (25) Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. ja Madle, S. (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung. *Mutation Res.* 410, s. 81–116.
- (26) Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. ja Madle, S. (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches. *Mutation Res.* 439, s. 183–190.
- (27) Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S. Y., Kasper, P. ja Müller, L. (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Res.* 445, s. 55–71.
- (28) von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H. G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. ja Madle, S. (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells – results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Res.* 468, s. 137–163.
- (29) Garriott, M. L., Phelps, J. B. ja Hoffman, W. P. (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Res.* 517, s. 123–134.
- (30) Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. ja Sofuni, T. (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis* 14, s. 569–580.
- (31) Elhajouji, A. ja Lorge, E. (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Res.* 607, s. 1–152.
- (32) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC:in 25. kokous, 16.–17. marraskuuta 2006. Saatavilla osoitteessa <http://ecvam.jrc.it/index.htm>
- (33) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Saatavilla osoitteessa <http://ecvam.jrc.it/index.htm>

- (34) Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S., van Benthem, J. ja Vanparys P. (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis* 23, s. 271–283.
- (35) Zhang, L. S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. ja Sofuni, T. (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Res.* 347, s. 105–115.
- (36) Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. ja Knasmeuller, S. (2002). Fumonisin B₁ is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis* 17, s. 257–260.
- (37) Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W. W., Hoelzl, C., Bichler, J. ja Majer, B. J. (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxins; current state of knowledge. *Toxicol.* 198, s. 315–328.
- (38) Gibson, D. P., Brauning, R., Shaffi, H. S., Kerckaert, G. A., LeBoeuf, R. A., Isfort, R. J. ja Aardema, M. J. (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Res.* 392, s. 61–70.
- (39) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. ja Myhr, B. C. (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.* 257, s. 147–205.
- (40) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. ja Okumura, K. (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Res.* 268, s. 297–305.
- (41) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environ. Mutagen.* 8, s. 789–886.
- (42) Fenech, M. ja Morley, A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Res.* 147, s. 29–36.
- (43) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Res.* 392, s. 11–18.
- (44) Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y. P., Ceppi, M., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M. P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L. R., Fucic, A., Lima, O. G., Hrelia, P., Krishnaja, A. P., Lee, T. K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W. U., Odagiri, Y., Scarffi, M. R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. ja Zijno, A. (2001). HUMAN MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes. I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ. Mol. Mutagen.* 37, s. 31–45.
- (45) Maron, D. M. ja Ames, B. N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.* 113, s. 173–215.
- (46) Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C. R. ja Zeiger, E. (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 4, s. 55–65.
- (47) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. ja Wolf, R. C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis* 7, s. 175–177.
- (48) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. ja Sugimura, T. (1976). A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, *teoksessa*: de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. ja Philpot, R. M. (ed.), *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, s. 85–88.
- (49) Johnson, T. E., Umbenhauer, D. R. ja Galloway, S. M. (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environ. Mol. Mutagen.* 28, s. 51–59.
- (50) UNEP (2001). Pysyviä orgaanisia yhdisteitä koskeva Tukholman yleissopimus. Yhdistyneiden kansakuntien ympäristöohjelma (UNEP). Saatavilla osoitteessa <http://www.pops.int/>

- (51) Doherty, A. T., Ellard, S., Parry, E. M. ja Parry, J. M. (1996). An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells. *Mutagenesis* 11, s. 247–274.
- (52) Krahn, D. F., Barsky, F. C. ja McCooey, K. T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, *teoksessa*: Tice, R. R., Costa, D. L. ja Schaich, K. M. (ed.), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, s. 91–103.
- (53) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. ja Brooks, A. L. (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environ. Mutagenesis* 5, s. 795–801.
- (54) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Res.* 285, s. 35–44.
- (55) Phelps, J. B., Garriott, M. L. ja Hoffman, W. P. (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Res.* 521, s. 103–112.
- (56) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A. ja Wakata, A. (2004). Corrigendum to 'Report from the *in vitro* micronucleus assay working group'. *Mutation Res.* 564, s. 97–100.
- (57) Pincu, M., Bass, D. ja Norman, A. (1984). An improved micronuclear assay in lymphocytes. *Mutation Res.* 139, s. 61–65.
- (58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. ja Kirkland, D. (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Res.* 655, s. 1–3.
- (59) Surrallés, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. ja Marcos, R. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Res.* 341, s. 169–184.
- (60) Galloway, S. (2000). Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay. *Environ. Molec. Mutagenesis* 35, s. 191–201.
- (61) Hayashi, M., Sofuni, T. ja Ishidate, M. Jr. (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Res.* 120, s. 241–247.
- (62) MacGregor, J. T., Wehr, C. M. ja Langlois, R. G. (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Res.* 120, s. 269–275.
- (63) Hayashi, M., Sofuni, T. ja Ishidate, M. Jr. (1983). An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutation Res.* 120, s. 241–247.
- (64) Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. ja Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Res.* 534, s. 65–75.
- (65) Hoffman, W. P., Garriott, M. L. ja Lee, C. (2003). *In vitro* micronucleus test, *teoksessa*: Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, 2. painos. S. Chow (toim.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, s. 463–467.
- (66) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetukset (EY) N:o 850/2004, annettu 29 päivänä huhtikuuta 2004, pysyvistä orgaanisista yhdisteistä sekä direktiivin 79/117/ETY muuttamisesta. EUVL L 229, 30.4.2004, s. 5.

Lisäys 1

Määritelmät

Aneugeeni: aine tai prosessi, joka vuorovaikutuksessa solun mitoottisen ja meioottisen jakautumissyklin vaiheiden kanssa johtaa solujen tai organismien aneuploidiaan.

Aneuploidia: yksittäisen tai useamman kuin yhden kromosomin mutta ei kuitenkaan koko kromosomiston (polyploidia) poikkeaminen kromosomien tavallisesta diploidisesta (tai haploidisesta) määrästä.

Apoptoosi: ohjelmoitunut solukuolema, jossa tietyt vaiheet johtavat solujen hajoamiseen solukalvon ympäröimiksi rakkuloiksi, jotka myöhemmin häviävät fagosytoosiin tai puhkeamisen seurauksena.

Solujen proliferaatio: solujen määrän kasvaminen solujen mitoottisen jakautumisen seurauksena.

Sentromeeri: kromosomin DNA:n alue, jossa kromatidit liittyvät yhteen ja johon molemmat kinetokorit kiinnittyvät rinnakkain.

Klastogeeni: aine tai prosessi, joka aiheuttaa rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia solu- tai organismipopulaatioissa.

Sytokineesi: solun jakautuminen välittömästi mitoosin jälkeen, jolloin muodostuu kaksi yksitumaista tytärsolua.

Sytokineesin eston proliferaatioindeksi: toisen jakautumisvaiheen solujen osuus käsitellyssä populaatiossa käsittelemättömään kontrollipopulaatioon verrattuna (katso kaava lisäyksessä 2).

Sytostaasi: solujen kasvun estäminen (katso kaava lisäyksessä 2).

Sytotoksisuus: solurakenteeseen kohdistuvat haitalliset vaikutukset tai toiminta, joka johtaa solukuolemaan.

Genotoksinen: yleinen nimitys kaikenlaisille DNA- tai kromosomivaurioille, muun muassa katkeamiselle, adduktien uudelleenjärjestäytymiselle, mutaatioille, kromosomipoikkeavuuksille ja aneuploidialle. Kaikki genotoksiset vaikutukset eivät johda mutaatioihin tai pysyviin kromosomivaurioihin.

Interfaasisolut: solut, jotka eivät ole mitoosivaiheessa.

Kinetokori: proteiinia sisältävä rakenne, joka rakentuu kromosomin sentromeerin kohdalle, johon tumasukkulat kiinnittyvät solun jakautumisen aikana ja jonka ansiosta tytärkromosomit voivat liikkua kohti tytärsolujen napoja.

Mikrotumat: pienet tumat, jotka eivät ole solujen varsinaisia tumia vaan esiintyvät niiden lisäksi ja jotka muodostuvat hitaasti liikkuvista kromosomifragmenteista tai kokonaisista kromosomeista mitoosin tai meioosin telofaasin aikana.

Mitoosi: solutuman jakautuminen, joka jaotellaan yleensä profaasiin, prometafaasiin, metafaasiin, anafaasiin ja telofaasiin.

Mitoosi-indeksi: suhdeluku, joka saadaan jakamalla metafaasissa olevien solujen määrä solupopulaatiossa todettujen solujen kokonaismäärällä; ilmoittaa solujen proliferaatioasteen kyseisessä solupopulaatiossa.

Mutageeninen: aiheuttaa periytyvän muutoksen geenien DNA:n emäsparirakenteessa tai kromosomirakenteessa (kromosomipoikkeavuudet).

Nondisjunktio: häiriö, jossa kromatidiparit eivät erkaannu toisistaan ja jakaudu oikein kehittyviin tytärsoluihin, minkä takia tytärsolujen kromosomimäärä poikkeaa tavallisesta.

Polyploidia: solujen tai organismien kromosomien lukumäärää koskeva poikkeavuus, joka koskee yksittäisen kromosomin tai kromosomien (aneuploidia) sijaan koko kromosomistoa.

Proliferaatioindeksi (PI): sytotoksisuuden mittausmenetelmä, kun sytoB:tä ei käytetä (katso kaava lisäyksessä 2).

Solumäärän suhteellinen lisääntyminen: sytotoksisuuden mittausmenetelmä, kun sytoB:tä ei käytetä (katso kaava lisäyksessä 2).

Populaation suhteellinen kaksinkertaistuminen: sytotoksisuuden mittausmenetelmä, kun sytoB:tä ei käytetä (katso kaava lisäyksessä 2).

Replikaatioindeksi (RI): altistus- ja palautumisjakson aikana päätyneiden solunjakautumissykliin osuus käsitellyssä viljelmässä verrattuna käsittelemättömään kontrolliviljelmään (katso kaava lisäyksessä 2).

Testikemikaali (testiaine): aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Lisäys 2

Kaavat sytotoksisuuden määrittämistä varten

1. Kun sytoB:tä käytetään, sytotoksisuuden arvioinnin on perustuttava sytokineesin eston proliferaatioindeksiin (SEPI) tai replikaatioindeksiin (RI) (16) (58). Sytokineesin eston proliferaatioindeksi ilmaisee solusyklien keskimääräistä määrää solua kohti sytoB:lle altistamisen aikana, ja sitä voidaan käyttää solujen proliferaation laskemiseen. RI ilmaisee tumien suhteellista määrää käsitellyissä viljelmissä verrattuna kontrolliviljelmiin, ja sitä voidaan käyttää sytostaasiasteen (sytostaasi-%) laskemiseen seuraavasti:

$$\text{sytostaasi-\%} = 100 - 100\{(\text{SEPI}_T - 1) \div (\text{SEPI}_C - 1)\}$$

ja:

T = testikemikaalilla käsitelty viljelmä

C = kantaja-ainekontrolliviljelmä

jossa:

$$\text{SEPI} = \frac{((\text{yksitumaisten solujen määrä}) + (2 \times \text{kaksitumaisten solujen määrä}) + (3 \times \text{monitumaisten solujen määrä}))}{(\text{solujen yhteenlaskettu määrä})}$$

Näin ollen, jos SEPI = 1 (kaikki solut ovat yksitumaisia), sytostaasi on 100 %.

$$\text{Sytostaasi} = 100 - \text{RI}$$

$$\text{RI} = \frac{((\text{kaksitumaisten solujen määrä}) + (2 \times \text{monitumaisten solujen määrä})) \div (\text{solujen yhteenlaskettu määrä})_T}{((\text{kaksitumaisten solujen määrä}) + (2 \times \text{monitumaisten solujen määrä})) \div (\text{solujen yhteenlaskettu määrä})_C} \times 100$$

T = käsitellyt viljelmät

C = kontrolliviljelmät

2. Näin ollen, jos RI = 53 %, kontrolliviljelmässä kaksitumaisiksi ja monitumaisiksi soluiksi jakaantuneiden solujen määrään verrattuna vain 53 % soluista jakaantui käsitellyssä viljelmässä, eli sytostaasi on 47 %.

3. Kun sytoB:tä ei käytetä, sytotoksisuus on arvioitava solumäärän suhteellisen lisääntymisen (SMSL) tai populaation suhteellisen kaksinkertaistumisen (PSK) perusteella (58), koska molemmissa otetaan huomioon jakaantuneen solupopulaation osuus.

$$\text{SMSL} = \frac{(\text{solumäärän lisääntyminen käsitellyissä viljelmissä (lopussa – alussa)})}{(\text{solumäärän lisääntyminen kontrolliviljelmissä (lopussa – alussa)})} \times 100$$

$$\text{PSK} = \frac{(\text{populaatioiden kaksinkertaistumisten lukumäärä käsitellyissä viljelmissä})}{(\text{populaatioiden kaksinkertaistumisten lukumäärä kontrolliviljelmissä})} \times 100$$

jossa:

$$\text{populaation kaksinkertaistuminen} = [\log (\text{solumäärä käsittelyn jälkeen} \div \text{alkuperäinen solumäärä})] \div \log 2$$

4. Näin ollen, jos SMSL tai PSK = 53 %, sytotoksisuus/sytostaasi = 47 %.

5. Sytotoksisuutta voidaan arvioida proliferaatioindeksin (PI) avulla laskemalla 1 solusta (kl1), 2 solusta (kl2), 3 tai 4 solusta (kl4) ja 5–8 solusta (kl8) muodostuneiden kloonien määrä seuraavasti

$$\text{PI} = \frac{((1 \times \text{kl1}) + (2 \times \text{kl2}) + (3 \times \text{kl4}) + (4 \times \text{kl8}))}{(\text{kl1} + \text{kl2} + \text{kl4} + \text{kl8})}$$

6. Proliferaatioindeksiä on käytetty sytotoksisuuden tärkeänä ja luotettavana parametrina myös ilman sytoB:tä *in situ* viljellyille solulinjoille (25) (26) (27) (28).

Lisäys 3

Suorituskyvyn arviointiin suositeltavat vertailukemikaalit ⁽¹⁾

Luokka	Kemikaali	CAS-numero	EC-numero
1. Klastogeenit, jotka ovat aktiivisia ilman metabolista aktivaatiota			
	Sytosiinarabinosidi	147-94-4	205-705-9
	Mitomysiini C	50-07-7	200-008-6
2. Klastogeenit, jotka edellyttävät metabolista aktivaatiota			
	Bentso(a)pyreeni	50-32-8	200-028-5
	Syklofosfamidi	50-18-0	200-015-4
3. Aneugeenit			
	Kolkisiini	64-86-8	200-598-5
	Vinblastiini	143-67-9	205-606-0
4. Negatiiviset aineet			
	Di(2-etyyliheksyyli)ftalaatti	117-81-7	204-211-0
	Nalidiksiinihappo	389-08-2	206-864-7
	Pyreeni	129-00-0	204-927-3
	Natriumkloridi	7647-14-5	231-598-3

⁽¹⁾ Vertailukemikaalien käyttöä suositellaan. Korvaavia tai täydentäviä kemikaaleja voidaan lisätä vertailukemikaalien luetteloon, jos niiden vaikutus on tiedossa ja ne indusoivat mikrotumia samoilla toimintamekanismeilla ja jos niiden osoitetaan olevan merkityksellisiä MNvit-menetelmällä testattavien kemikaalien osalta. Käyttötarkoituksesta riippuen perusteluna voidaan esittää myös muun muassa validointitutkimus, jossa on käytetty useita eri aineita tai jossa keskitytään kapeampaan kirjoon testiaineen kemikaaliluokan tai tutkittavan vauriomekanismin perusteella.

B.50. IHOHERKISTYKS: PAIKALLINEN IMUSOLMUKEMÄÄRITYSMENETELMÄ: DA

JOHDANTO

- Kemikaalien testausta koskevia OECD:n suuntaviivoja ja EU:n testimenetelmiä tarkistetaan säännöllisesti tieteellisen kehityksen, muuttuvien sääntelytarpeiden ja eläinten hyvinvointiin liittyvien kysymysten perusteella. Ensimmäinen, hiiren ihoherkistykseen määrittämisessä käytettävä testimenetelmä (B.42) eli paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä (Local Lymph Node Assay, LLNA; OECD:n testiohje 429) on tarkistettu (1). LLNA-menetelmän validointia koskevat yksityiskohtaiset tiedot ja siihen liittyvän työn arviointi on julkaistu (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) LLNA-menetelmässä lymfosityyttien proliferaatio määritetään radioisotoopilla leimatun tymidiinin tai jodin avulla. Siksi määrittäminen on ongelmallista. LLNA: DA -menetelmä (jonka on kehittänyt Daicel Chemical Industries, Ltd) on LLNA-menetelmän mukautus, jossa ei käytetä radioaktiivisia merkkiaineita, vaan jossa lymfosityyttien proliferaatio määritetään bioluminesenssin avulla määritettävän adenosiniinifosfaattipitoisuuden (ATP-pitoisuuden) avulla. Kansainvälinen vertaisarviointiryhmä on arvioinut LLNA: DA -testimenetelmän, validoinut sen ja katsonut, että sillä voidaan määrittää ihoa herkistäviä ja muunlaisia kemikaaleja tietyin rajoituksin (10) (11) (12) (13). Tässä selostettu testimenetelmä on suunniteltu kemikaalien (aineiden ja seosten) ihoherkistyspotentiaalin arvioimiseen eläimillä. Tämän liitteen B.6 luvussa ja OECD:n testiohjeessa 406 käytetään marsutestejä, erityisesti marsuilla tehtävää maksimointitestiä ja Bühlerin testiä (14). Käytettäessä LLNA-menetelmää (tämän liitteen B.42 luku; OECD:n testiohje 429) ja sen kahta muuhun kuin radioaktiivisuuteen perustuvaa muunnosta eli LLNA: DA -menetelmää (tämän liitteen B.50 luku; OECD:n testiohje 442 A) ja LLNA: BrdU-ELISA -menetelmää (tämän liitteen B.51 luku; OECD:n testiohje 442 B) voidaan testeihin käytettävien eläinten määrää vähentää. Näin ollen ne ovat eläinten käytön osalta edistyneempiä B.6 luvussa ja OECD:n testiohjeessa 406 (14) tarkoitettuihin marsutesteihin verrattuna.
- Kuten LLNA-menetelmässä, myös LLNA: DA -menetelmässä tutkitaan ihoherkistykseen induktiovaihetta ja tuotetaan annosvasteen arviointiin sopivia kvantitatiivisia tuloksia. Koska ihoa herkistäviä aineita voidaan tunnistaa ilman radioaktiivista DNA-merkkiainetta, työssä ei altistuta radioaktiivisuudelle, eikä jätteiden hävittäminen aiheuta ongelmia. Tämä voi johtaa hiirten entistä yleisempään käyttöön ihoa herkistävien aineiden tunnistamisessa, millä puolestaan vähennetään entisestään marsujen käyttämistä ihoherkistyspotentiaalin testauksessa (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406) 0.

MÄÄRITELMÄT

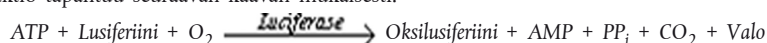
- Sovellettavat määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

JOHDANTO JA RAJOITUKSET

4. LLNA: DA -menetelmä on LLNA-menetelmän muunnos, jolla voidaan tunnistaa mahdollisia ihoa herkistäviä kemikaaleja tietyin rajoituksin. Tämä ei välttämättä merkitse sitä, että LLNA: DA -menetelmää pitäisi käyttää kaikissa tapauksissa LLNA-menetelmän tai marsutestin asemesta (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406) (14), vaan pikemminkin sitä, että määritysmenetelmä on yhtä hyvä ja sitä voidaan käyttää vaihtoehtona, jossa positiivisia ja negatiivisia tuloksia ei yleensä enää tarvitse varmistaa uudelleen (10) (11). Testilaboratorion on otettava huomioon kaikki testiaineesta saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen tekemistä. Tällaisia tietoja ovat muun muassa testiaineen tunnistetiedot ja kemiallinen rakenne, sen fysikaaliskemialliset ominaisuudet, muiden testiaineella tehtyjen *in vitro*- tai *in vivo* -myrkyllisyystestien tulokset sekä rakenteellisesti samankaltaisia kemikaaleja koskevat toksikologiset tiedot. Tietojen perusteella on määritettävä, voidaanko LLNA: DA -menetelmää käyttää kyseisen aineen testaamiseen (ottaen huomioon, että LLNA: DA -menetelmä ei sovellu tiettyjen kemikaaliryppien testaamiseen (katso 5 kohta)) ja mitä annosta on käytettävä.
5. LLNA: DA on *in vivo* -menetelmä, joten sillä ei lopeteta koe-eläinten käyttöä kosketusherkistykseen arvioinnissa. Sillä voidaan kuitenkin vähentää tähän tarkoitukseen käytettävien eläinten määrää marsutesteihin verrattuna (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406) (14). LLNA: DA -menetelmässä käytetty tapa testata kosketusherkistystä eläimillä on myös huomattavasti edistyneempi (vähemmän kipua ja kärsimystä), koska toisin kuin B.6 menetelmässä ja OECD:n testiohjeessa 406, LLNA: DA -menetelmässä ei edellytetä tarkoituksellista ihon yliherkkyyssreaktioiden tuottamista. Vaikka LLNA: DA -menetelmä onkin tietyllä tasolla edistyneempi kuin B.6 menetelmä tai OECD:n testiohje 406 (14), siihen liittyy tiettyjä rajoituksia, joiden vuoksi voi olla tarpeen käyttää B.6 menetelmää tai OECD:n testiohjetta 406 (esimerkiksi tiettyjen metallien testaus, väärät positiiviset löydökset joidenkin ihoa ärsyttävien aineiden, esimerkiksi pinta-aktiivisten aineiden osalta (6) (1 ja tämän liitteen B.42 luku) tai testiaineen liukoisuus). Määrittystä häiritseviä (16) funktionaalisia ryhmiä sisältävien kemikaaliluokkien tai aineiden yhteydessä voi olla tarpeen käyttää marsutestejä (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406 (14)). Suositellaan, että LLNA-menetelmälle asetettuja rajoituksia (1 ja tämän liitteen B.42 luku) sovelletaan myös LLNA: DA -menetelmään (10). LLNA: DA -menetelmä ei välttämättä sovellu ATP-pitoisuuksiin vaikuttavien, esimerkiksi ATP-inhibiittoreina toimivien aineiden tai sellaisten aineiden testaukseen, jotka vaikuttavat solun sisäisen ATP:n täsmälliseen määrittämiseen (esimerkiksi ATP:tä hajottavat entsyymit, solun ulkopuolinen ATP imusolmukkeessa). Tällaisia tunnettuja rajoituksia lukuun ottamatta aineet on testattava LLNA: DA -menetelmällä, elleivät kyseisten aineiden ominaisuudet vaikuta LLNA: DA -menetelmän tarkkuuteen. Myös positiivisten rajatulosten mahdollisuus on otettava huomioon, kun saadaan stimulaatioindeksiksi (SI) välillä 1,8–2,5 (katso 31–32 kohta). Tämä perustuu 44 aineen validointitietokantaan, jossa aineiden SI $\geq 1,8$ (katso 6 kohta) ja jossa LLNA: DA -menetelmällä on tunnistettu oikein kaikki 32 herkistystä aiheuttavaa LLNA-ainetta mutta tunnistettu väärin kolme niistä 12 muusta kuin herkistystä aiheuttavasta LLNA-aineesta, joiden SI-arvo on 1,8–2,5 (positiivinen rajatulos) (10). Koska samaa tulosjoukkoa on käytetty SI-arvojen määrittämiseen ja testin ennakoivien ominaisuuksien laskemiseen, esitetyissä tuloksissa voidaan yliarvioida todellisia ennakoivia ominaisuuksia.

TESTIMENETELMÄN PERIAATE

6. LLNA: DA -menetelmän peruseriaate on, että ihoa herkistävät aineet aiheuttavat lymfositien proliferaatiota imusolmukkeissa, jotka dreneeraavat testiaineen annostelualueen. Tämä proliferaatio on suhteessa käytettyyn annokseen ja allergeenin voimakkuuteen ja tarjoaa yksinkertaisen keinon ihoherkistykseen mittaamiseksi kvantitatiivisella tavalla. Proliferaatio mitataan vertaamalla kussakin testiryhmässä tapahtuvaa keskimääräistä proliferaatiota pelkästään kantaja-aineella käsitellyssä kontrolliryhmässä tapahtuvaan keskimääräiseen proliferaatioon. Kunkin testiryhmän keskimääräisen proliferaation ja sitä vastaavan kontrolliryhmän keskimääräisen proliferaation suhde (SI) määritetään, ja sen on oltava yhtä suuri tai suurempi kuin 1,8, jotta testiaine olisi syytä arvioida tarkemmin mahdollisesti ihoherkistystä aiheuttavaksi. Tässä määrittysmenetelmässä kuvatut menettelyt perustuvat ATP-pitoisuuden mittaamiseen bioluminesenssin avulla (sen tiedetään korreloivan elävien solujen määrää) (17), millä määritetään solujen proliferaation lisääntyminen dreneeraavissa korvaleden imusolmukkeissa (18) (19). Bioluminesenssimenetelmässä lusiferaasientsyymi katalysoi valon muodostusta (luminesenssia) ATP:sta ja lusiferiinistä. Reaktio tapahtuu seuraavan kaavan mukaisesti:



ATP	ATP
Luciferin	lusiferiini
O ₂	O ₂
Luciferase	lusiferaasi
Oxyluciferin	oksilusiferiini
AMP	AMP
PP _i	PP _i
CO ₂	CO ₂
Light	valo

Emittoituneen valon valovoima on suoraan verrannollinen ATP-pitoisuuteen, ja se mitataan luminometrillä. Lusiferiini-lusiferaasi-määrittysmenetelmä on herkkä ATP-pitoisuuden määrittäminen, jota käytetään erilaisissa käyttökohteissa (20).

MÄÄRITYSMENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

7. Tähän testiin paras eläinlaji on hiiri. LLNA: DA -määrittysmenetelmän validointitutkimukset on tehty yksinomaan CBA/J-kannalla, joten sen käyttöä suositellaan (12) (13). Määrittysmenetelmässä käytetään nuoria täysikasvuisia naarashiiriä, jotka eivät ole poikineet eivätkä ole tiineenä. Testin alussa eläinten on oltava 8–12 viikon ikäisiä, ja eläinten painoerojen on oltava vähäisiä eli enintään 20 prosenttia keskipainosta. Muita kantoja tai uroseläimiä voidaan käyttää, jos tietoja tuotetaan riittävästi sen osoittamiseksi, että LLNA: DA -vasteessa ei esiinny merkitseviä koe-eläinkantaan tai sukupuoleen liittyviä eroja.

Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta

8. Hiiret on pidettävä yhteishäkeissä (21), ellei hiirien pitämiseksi erillisissä häkeissä esitetä riittäviä tieteellisiä perusteluja. Koe-eläintilan lämpötilan on oltava 22 ± 3 celsiusastetta. Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70:tä prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa on käytettävä keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa.

Eläinten valmistelu

9. Eläimet valitaan satunnaistetusti, merkitään niin, että yksilöt voidaan erottaa toisistaan (ei kuitenkaan korvamerkeillä), ja pidetään häkeissä vähintään viiden päivän ajan ennen testiaineen annostelun aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-olosuhteisiin. Ennen käsittelyn alkua kaikki eläimet on tutkittava sen varmistamiseksi, ettei niillä ole havaittavia ihovaurioita.

Annosteluliusten valmistelu

10. Kiinteät kemikaalit on liuotettava tai sekoitettava liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja tarvittaessa laimennettava ennen niiden annostelua hiiren korvaan. Nestemäiset kemikaalit voidaan annostella laimentamattomana, tai ne voidaan laimentaa ennen annostelua. Liukenemattomat kemikaalit, kuten lääkinnällisissä laitteissa yleisesti käytetyt kemikaalit, on uutettava erittäin voimakkaasti asianmukaiseen liuottimeen, jotta saataisiin testausta varten esiin kaikki uuttuvat ainesosat ennen annostelua hiirten korviin. Testiaineet on valmistettava päivittäin, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiileittutkimuksilla.

Luotettavuuden tarkistus

11. Määritysmenetelmän toimivuus osoitetaan positiivisten kontrollikemikaalien avulla. Herkistystesteissä käytettävän aineen vasteena on saatava aikaan riittävä ja toistettavissa oleva herkistyminen. Vasteen on oltava aineelle tyyppinen. Samanaikaisesti on käytettävä positiivista kontrollikemikaalia, koska sillä osoitetaan, että laboratoriollla on riittävä pätevyys kunkin määritysmenetelmän käyttöön. Sen avulla voidaan myös arvioida laboratoriodenvälistä ja laboratorionsisäistä uusittavuutta ja vertailtavuutta. Jotkut sääntelyviranomaiset vaativat positiivisten kontrollikemikaalien käyttämistä kaikissa tutkimuksissa. Käyttäjien olisikin otettava yhteyttä asiasta vastaaviin viranomaisiin ennen LLNA: DA -määritysmenetelmän käyttöönottoa. Tämän takia suositellaan, että positiivista kontrollikemikaalia käytetään aina näytteiden kanssa samanaikaisesti, jotta ei tarvitsisi tehdä uusia eläinkokeita sellaisten vaatimusten täyttämiseksi, jotka aiheutuvat positiivisten kontrollikemikaalien käyttämisestä vain silloin tällöin (katso 12 kohta). Positiivisen kontrollikemikaalin on tuotettava positiivinen LLNA: DA -vaste altistustasolla, jonka odotetaan antavan negatiiviseen kontrolliryhmään verrattuna stimulaatioindeksi, joka on yhtä suuri tai suurempi kuin 1,8. Positiivisen kontrollikemikaalin annospitoisuus on valittava siten, että se ei aiheuta liian voimakasta ihoärsytystä tai koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja että induktio on toistettavissa mutta ei liian suuri (esimerkiksi $SI > 10$ on liian suuri). Suositeltavia positiivisia kontrollikemikaaleja ovat 25-prosenttinen heksyylikanalidehydi (CAS-numero 101-86-0) ja 25-prosenttinen eugenoli (CAS-numero 97-53-0) asetonin ja oliiviöljyn seoksessa (4:1 v/v). Joissakin olosuhteissa voidaan riittävin perustein käyttää muita positiivisia kontrollikemikaaleja, jotka täyttävät edellä mainitut kriteerit.
12. Vaikka positiivisen kontrolliryhmän samanaikaista käyttöä suositellaan, joissakin tapauksissa positiivisen kontrollikemikaalin testaus ajoittain (enintään kuuden kuukauden välein) voi riittää LLNA: DA -menetelmää säännöllisesti käyttävissä laboratorioissa (eli sellaisissa, jotka käyttävät LLNA: DA -menetelmää vähintään kerran kuukaudessa), joilla on aiempia positiivisen kontrollikemikaalin määritystietoja, jotka osoittavat laboratorion valmiuden saada aikaan uusittavissa olevia ja täsmällisiä tuloksia positiivisilla kontrollikemikaaleilla. Riittävä LLNA DA -menetelmää koskeva pätevyys voidaan osoittaa tuottamalla positiivisella kontrollikemikaalilla toistuvasti samantasoisia positiivisia tuloksia vähintään kymmenessä riippumattomassa testissä, jotka suoritetaan kohtuullisen ajanjakson (alle yhden vuoden) aikana.
13. Samanaikaista positiivista kontrolliryhmää olisi käytettävä aina, kun LLNA: DA -menettelyjä muutetaan (esimerkiksi kun koulutettu henkilökunta vaihtuu, testimenetelmän materiaalit ja/tai reagenssit vaihtuvat, testimenetelmässä käytettävät laitteet vaihtuvat tai koe-eläinten alkuperä vaihtuu). Tällaiset muutokset on kirjattava laboratorioraportteihin. Muutosten vaikutusta aiempien määritystietojen asianmukaisuuteen on tarkasteltava, jotta voidaan päättää, onko kerättävä uusi määritystietoja positiivisen kontrollikemikaalin tulosten yhdenmukaisuuden osoittamiseksi.
14. Tutkijoiden on otettava huomioon, että jos positiivisen kontrollikemikaalin tutkimusta ei suoriteta samanaikaisesti vaan vain ajoittain, negatiivisten tutkimustulosten asianmukaisuus ja hyväksyttävyys voivat vaarantua, jos samanaikaista positiivista kontrollia ei testata ajoittain tehtyjen positiivisten kontrollitestien välillä. Jos esimerkiksi saadaan väärä negatiivinen tulos, kun positiivinen kontrolli ei ole ollut aina samanaikaisesti mukana, positiivisen kontrollikemikaalin viimeisen hyväksytyyn yksittäisen tutkimuksen ja positiivisen kontrollikemikaalin hylätyn yksittäisen tutkimuksen tuloksen välisenä aikana saadut testiaineen negatiiviset tulokset voivat olla kyseenalaisia. Näiden tulosten seurauksia on tarkasteltava huolellisesti päätettäessä positiivisten kontrollikemikaalien käyttämisestä testiaineen kanssa samanaikaisesti tai vain ajoittain. Olisi myös harkittava pienemmän eläinmäärän käyttämistä testiaineen kanssa samanaikaisesti tehtävää positiivista kontrolliryhmää varten, jos se on tieteellisesti perusteltua ja jos laboratorio osoittaa laboratoriokohtaisten aiempien tietojen perusteella, että hiiriä voidaan käyttää vähemmän (22).

15. Vaikka positiiviset kontrollikemikaalit olisi mieluiten testattava kantaja-aineessa, jonka tiedetään antavan aina samanlaisen vasteen (esimerkiksi asetoniliiviöljy, 4:1 v/v), voi joidenkin säännösten mukaan olla tarpeen testata aine myös muussa kuin vakiokantaja-aineessa (kliinisesti/kemiallisesti relevantissa aineessa (23)). Jos positiivista kontrollikemikaalia testataan samanaikaisesti eri kantaja-aineessa kuin testiainetta, on samanaikaista positiivista kontrollikemikaalia varten käytettävä erillistä kantaja-ainekontrollia.
16. Arvioitaessa tiettyyn kemikaaliluokkaan kuuluvia tai tietyn vastetason aikaansaavia aineita voidaan myös vertailu-aineita käyttää osoittamaan, että testimenetelmällä voidaan osoittaa asianmukaisesti tämäntyyppisten aineiden ihoherkistyspotentiaali. Vertailuaineilla olisi oltava seuraavat ominaisuudet:
- samanlainen rakenne ja toiminta kuin testattavalla aineryhmällä
 - tunnetut fysikaalis-kemialliset ominaisuudet
 - sopivuutta tukevia tietoja LLNA: DA -menetelmästä
 - sopivuutta tukevia tietoja muista eläinmalleista ja/tai ihmisistä.

TESTIMENETTELY

Koe-eläinten määrä ja annostasot

17. Kussakin annostasoryhmässä on oltava vähintään neljä eläintä, ja testiaineesta on käytettävä vähintään kolmea konsentraatiota; lisäksi käytetään samanaikaisesti määritettävää negatiivista kontrolliryhmää, joka käsitellään vain testiaineen kantaja-aineella, sekä positiivista kontrolliryhmää (joka määritetään samanaikaisesti tai joka on määritetty hiljattain, laboratorion toimintatavan mukaisesti, ottaen huomioon 11–15 kohdat). Positiivisesta kontrolliryhmästä on tarvittaessa testattava useita annoksia, etenkin jos positiivista kontrollikemikaalia testataan epäsuorasti. Kontrolliryhmän eläimiä on kohdeltava samalla tavoin kuin testiryhmän eläimiä, paitsi että niitä ei käsitellä testiaineella.
18. Annostasot ja kantaja-aine on valittava lähteissä (2) ja (24) esitettyjen suositusten perusteella. Annostasot valitaan yleensä sopivasta konsentraatiosarjasta, esimerkiksi sarjasta 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % ja niin edelleen. Käytettävälle konsentraatiosarjalle on esitettävä asianmukaiset tieteelliset perustelut. Kaikki käytettävissä olevat toksikologiset tiedot (esimerkiksi akuutti toksisuus ja ihoärsytys) sekä rakennetta ja fysikaaliskemiallisia ominaisuuksia koskevat tiedot kyseisestä testiaineesta (ja/tai rakenteellisesti vastaavista aineista) on tarvittaessa otettava huomioon kolmen peräkkäisen konsentraation valinnassa niin, että suurin konsentraatio edustaa maksimialtistusta, mutta koko elimistöön kohdistuva toksisuus ja/tai liian voimakas paikallinen ihoärsytys kuitenkin vältetään (24) (25). Jos tällaisia tietoja ei ole käytettävissä, voi olla tarpeen tehdä esitesti (katso 21–24 kohta).
19. Kantaja-aine ei saa vaikuttaa testituloksiin tai vääristää niitä. Se on valittava siten, että testiaine liukenee siihen mahdollisimman helposti ja aineen konsentraatio annosteluun sopivassa liuoksessa tai suspensiossa on mahdollisimman suuri. Suositeltavat kantaja-aineet ovat asetoniliiviöljy (4:1 v/v), N,N-dimetyyliformamidi, metyylietyyliketoni, propyleeniglykoli ja dimetyylisulfoksidi (6), mutta muitakin kantaja-aineita voidaan käyttää riittävän tieteellisin perustein. Joissakin tilanteissa voi olla tarpeen käyttää lisäkontrolliaineena kliinisesti perusteltua liuotinta tai kaupallista valmistetta, jona testiainetta markkinoidaan. Erityisesti on varmistettava, että hydrofiiliset testiaineet sisällytetään sellaiseen kantaja-ainejärjestelmään, joka vettää ihon eikä valu heti pois, lisäämällä asianmukaisia liukenemista edistäviä aineita (esimerkiksi 1-prosenttinen Pluronic® L92). Pelkkiä vesiliukoksia on siis syytä välttää.
20. Yksittäisiä hiirten imusolmukkeita prosessoimalla voidaan arvioida eläintenvälistä vaihtelua ja verrata tilastollisesti testiaineella ja kantaja-aineella käsiteltyjen ryhmien tuloksia (katso 33 kohta). Positiivisen kontrolliryhmän hiirten määrän vähentäminen voi olla mahdollista, mutta vain siinä tapauksessa, että tietoja kerätään yksittäisistä eläimistä (22). Tietyt sääntelyviranomaiset vaativat, että tietoja on kerättävä yksittäisistä eläimistä. Yksittäisiä eläimiä koskevien tietojen säännöllisellä keräämisellä edistetään eläinten hyvinvointia, koska siten vältetään päällekkäiset testaukset, jotka ovat tarpeen, jos sääntelyviranomaisten on tarkasteltava tietyllä tavalla (esimerkiksi eläimistä saatuja mittaustietoja yhdistämällä) saatuja testiainetuloksia myöhemmin muiden vaatimusten (esimerkiksi yksittäisiä eläimiä koskevat tiedot) perusteella.

Testiä edeltävä kartoitus

21. Jos ei ole tietoja, joiden perusteella päätetään suurin testattava annos (katso 18 kohta), on LLNA: DA -menetelmän testeissä käytettävä asianmukainen annostasot selvitettävä ennen päätestiä. Siten saadaan apua enimmäisannoksen valintaan varsinaista LLNA: DA -tutkimusta varten, kun tietoja koko elimistöön kohdistuvan toksisuuden (katso 24 kohta) ja/tai liian voimakkaan paikallisen ihoärsytyksen (katso 23 kohta) aiheuttavasta konsentraatiosta ei ole saatavilla. Testattavan enimmäisannoksen on vastattava sataa prosenttia nestemäisen testiaineen osalta tai suurinta mahdollista konsentraatiota kiinteiden tai suspendoitujen aineiden osalta.

22. Kartoitustesti suoritetaan varsinaista LLNA: DA -tutkimusta vastaavissa olosuhteissa, kuitenkin niin, että imusolmukkeiden proliferaatiota ei arvioida ja kussakin annosryhmässä voidaan käyttää vähemmän eläimiä. Kussakin annosryhmässä olisi hyvä käyttää yhtä tai kahta eläintä. Kaikkia hiiriä tarkkaillaan päivittäin koko elimistöön kohdistuvan toksisuuden tai annostelukohdassa esiintyvän paikallisen ärsytyksen kliinisten merkkien havaitsemiseksi. Eläinten paino kirjataan ennen testaamista ja ennen eläinten lopettamista (päivä 8). Kunkin hiiren molemmista korvista tutkitaan eryteeman merkit, ja ne pisteytetään taulukon 1 mukaisesti (25). Korvan paksuus mitataan paksuusmittarilla (esimerkiksi digitaalisella mikrometrillä tai Peacock Dial -paksuusmittarilla) päivänä 1 (ennen annosta), päivänä 3 (noin 48 tunnin kuluttua ensimmäisestä annoksesta), päivänä 7 (24 tuntia ennen lopettamista) ja päivänä 8. Päivänä 8 korvan paksuus voidaan määrittää myös mittaamalla korvan lävistämiseen tarvittava massa sen jälkeen, kun eläimet on lopetettu humanisti. Paikallinen ärsytys on erittäin voimakas, jos eryteemapisteytyksen arvo ≥ 3 ja/tai korvan paksuuntuminen ≥ 25 prosenttia minä tahansa mittauspäivänä (26) (27). Suurin varsinaiseen LLNA: DA -tutkimukseen valittava annos on kartoitusta varten määritetyn konsentraatiosarjan (katso 18 kohta) suurin annos, joka ei enää aiheuta koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja/tai liian voimakasta paikallista ihoärsytystä.

Taulukko 1

Eryteemapisteytys

Havainto	Pisteet
Ei eryteemaa	0
Hyvin lievä eryteema (tuskin havaittava)	1
Selkeästi erottuva eryteema	2
Keskivakava–vakava eryteema	3
Vakava eryteema (voimakas punoitus)–karsta, joka estää eryteeman pisteytyksen	4

23. Paitsi korvien paksuuden tilastollisesti merkittävää yli 25 prosentin kasvua (26) (27), myös tilastollisesti merkittävää käsiteltyjen hiirten korvien paksuuden lisääntymistä kontrollihiiriin verrattuna on käytetty ärsyttävien aineiden tunnistamiseksi LLNA-menetelmässä (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Tilastollisesti merkittävää paksuuntumista voi esiintyä silloinkin, kun korvan paksuuntuminen on alle 25 prosenttia, mutta sen ei katsota liittyvän spesifisesti erittäin voimakkaaseen ärsytykseen (30) (31) (32) (33) (34).
24. Seuraavat kliiniset havainnot voivat kokonaisvaltaisessa arvioinnissa olla osoituksena koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta (35) ja voivat näin ollen olla osoituksena suurimmasta annostasosta, jota varsinaisessa LLNA: DA -menetelmässä voidaan käyttää: muutokset hermoston toiminnassa (esimerkiksi karvojen jäykistyminen, ataksia, vapina ja kouristukset); muutokset käyttäytymisessä (esimerkiksi aggressiivisuus, muutokset turkin hoidossa, aktiivisuustason huomattava muuttuminen); muutokset hengityksessä (hengityksen säännöllisyyden ja syvyyden muutokset, kuten hengenahdistus, hengen haukkominen ja rahina) sekä muutokset ravinnon ja veden kulutuksessa. Arvioinnissa on huomioitava myös letargian ja/tai passiivisuuden merkit, vähäistä tai hetkittäistä kipua suuremman kivun ja kärsimyksen mahdolliset kliiniset merkit tai eläimen painon yli viiden prosentin laskeminen päivästä 1 päivään 8 sekä kuolleisuus. Kuolevat eläimet tai eläimet, jotka osoittavat selviä merkkejä voimakkaasta kivusta ja kärsimyksestä, on lopetettava humanisti (36).

Varsinaisen tutkimuksen aikataulu

25. Määritysmenetelmän aikataulu on seuraava:

- *Päivä 1:* Määritetään ja kirjataan kunkin koe-eläimen paino ja tehdään mahdollisia kliinisiä havaintoja. Kunkin korvan takaosaan annostellaan 1-prosenttista natriumlauryylisulfaattivesiliuosta (NLS) NLS-liuokseen upotettulla siveltimellä niin että kunkin korvan takaosa peittyy neljällä tai viidellä sivellyksellä. Yhden tunnin kuluttua NLS-käsittelystä kunkin korvan takaosaan annostellaan 25 µl testiainetta, kantaja-ainetta tai positiivisen kontrollikemikaalin (samanaikaisen tai hiljattain tehdyn, laboratorion toimintatavan mukaisesti, ottaen huomioon 11–15 kohdat) sopivaa laimennosta.
- *Päivät 2, 3 ja 7:* Toistetaan päivänä 1 suoritettu 1-prosenttisella NLS-vesiliuoksella tehty alustava käsittely ja testiainetta annostelu.
- *Päivät 4, 5 ja 6:* Ei käsittelyä.
- *Päivä 8:* Kirjataan kunkin koe-eläimen paino ja tehdään mahdollisia kliinisiä havaintoja. Noin 24–30 tunnin kuluttua päivänä 7 tehdyn annostelun aloittamisesta eläimet lopetetaan humanisti. Hiiren kummastakin korvasta leikataan irti dreneeraavat korvavahden imusolmukkeet, ja kunkin eläimen imusolmukkeet upotetaan fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (PBS). Imusolmukkeiden tunnistukseen ja poistamiseen liittyvät tiedot ja kaaviot esitetään lähteessä (22). Paikallista ihovastetta voidaan seurata varsinaisessa tutkimuksessa edelleen sisällyttämällä tutkimussuunnitelmaan täydentäviä parametreja, kuten korvan eryteeman pisteytys tai korvan paksuutta koskevat mittaustulokset (saadaan joko paksuusmittarilla tai ruumiinavauksen yhteydessä tehtävillä korvan lävistämiseen tarvittavan massan mittauksilla).

Solususpensioiden valmistus

26. Kunkin hiiren imusolmukeparien soluista valmistetaan yksisolususpensio asettamalla imusolmukkeet kahden objektilasin väliin ja painamalla niitä kevyesti imusolmukkeiden murskaamiseksi. Tämän jälkeen varmistetaan, että kudosa on levinnyt objektilaseille ohuesti, ja objektilasit irrotetaan toisistaan varovasti. Molemmilla objektilaseilla oleva kudosa suspendoidaan PBS-liuokseen niin, että kumpaakin objektilasia pidetään kallistettuna petrimaljan yläpuolella ja huuhdellaan PBS-liuoksella samalla, kun kudosta raaputetaan objektilasista soluraaputtimella. Negatiivisen kontrolliryhmän eläinten imusolmukkeet ovat pieniä, joten vaihe on suoritettava huolellisesti SI-arvoihin mahdollisesti vaikuttavien artefaktien välttämiseksi. Molemmat objektilasit on huuhdeltava yhteensä 1 ml:lla PBS-liuosta. Imusolmukeparien soluista petrimaljaan valmistettu suspensio homogenoidaan kevyesti soluraaputtimella. Tämän jälkeen imusolmukeparien soluista valmistetusta suspensiosta otetaan 20 µl:n mittausnäyte mikropipetillä niin, ettei näytteeseen tule mukaan silmämääräisesti havaittavaa kalvoa. Suspensio sekoitetaan 1,98 ml:aan PBS-liuosta, jolloin saadaan 2 ml:n näyte. Tämän jälkeen valmistetaan toinen 2 ml:n näyte samalla menetelmällä niin, että kustakin eläimestä saadaan kaksi näytettä.

Solujen proliferaation määrittäminen (lymfosyyttien ATP-pitoisuuden mittaaminen)

27. Imusolmukkeiden ATP-pitoisuuden kasvua mitataan lusiferiini/lusiferaasi-menetelmällä käyttämällä ATP-määrittämissä, jolla mitataan bioluminesenssia suhteellisinä valoyksikköinä (Relative Luminescence Unit, RLU). Määrittäminen tehdään aikana, joka ulottuu imusolmukkeiden eläimestä irrottamisesta ATP-pitoisuuden mittaamiseen. Sen on oltava kunkin eläimen osalta sama noin 30 minuutin tarkkuudella, sillä ATP-pitoisuuden katsotaan laskevan vähitellen sen jälkeen, kun eläin on kuollut (12). Näin ollen menetelmä, joka käynnistyy korvaleden imusolmukkeiden irrottamisesta ja päättyy ATP-mittaukseen, olisi saatava päätökseen 20 minuutin sisällä etukäteen määritettyyn määräaikaan mennessä, joka on sama kaikille eläimille. ATP:n luminesenssi on mitattava kustakin 2 ml:n näytteestä. Kullakin eläimellä tehdään siis yhteensä kaksi ATP-mittausta. Tämän jälkeen määritetään ATP:n keskimääräinen luminesenssi, jota käytetään myöhemmin tehtävissä laskelmissa (katso 30 kohta).

HAVAINNOT**Kliiniset havainnot**

28. Kustakin hiirestä on päivittäin havainnoitava huolellisesti mahdolliset kliiniset merkit joko annostelualueen paikallisesta ärsytyksestä tai koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta. Kaikki havainnot kirjataan järjestelmällisesti erikseen kustakin hiirestä. Seurantasuunnitelmassa on esitettävä myös perusteet, joiden avulla voidaan nopeasti tunnistaa hiiret, joissa havaitaan merkkejä koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta, liian voimakkaasta paikallisesta ihoärsytyksestä tai ihosyövyttävyydestä ja jotka on lopetettava (36).

Ruumiinpainot

29. Kuten 25 kohdassa todetaan, kukin eläin on punnittava erikseen testin alussa ja aikataulun mukaisesti humanin lopettamisen yhteydessä.

TULOSTEN LASKEMINEN

30. Kunkin käsittelyryhmän tulokset ilmoitetaan keskimääräisenä SI:nä. SI-arvo saadaan jakamalla testiaineryhmän ja positiivisen kontrolliryhmän hiirikohtaisista RLU-arvoista laskettu keskiarvo liuotin/kantaja-ainekontrollin vastaavalla tuloksella. Kantaja-ainekontrolliryhmien SI:n keskiarvo on 1.
31. Tulokset katsotaan positiiviseksi, kun $SI \geq 1,8$ (10). Rajatuloksen (SI-arvo 1,8–2,5) positiivisuuden määrittämiseksi voidaan kuitenkin tarkastella myös annos-vastesuhteen voimakkuutta, tilastollista merkitsevyyttä sekä liuotimen/kantaja-aineen ja positiivisen kontrollikemikaalin vasteiden yhdenmukaisuutta (2) (3) (37).
32. Jos positiivisen rajavasteen SI on 1,8–2,5, käyttäjät voivat tulosten positiivisuuden vahvistamiseksi tarkastella SI-arvojen lisäksi myös muita tietoja, kuten annos-vastesuhdetta, merkkejä koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta tai liian voimakkaasta ärsytyksestä ja tarvittaessa tilastollista merkittävyyttä (10). Lisäksi on syytä ottaa huomioon testiaineen ominaisuudet, mukaan luettuina mahdolliset rakenteelliset yhtäläisyydet tunnettuihin ihoherkistävistä aiheuttaviin aineisiin, sen hiirelle mahdollisesti aiheuttama erittäin voimakas ihoärsytys ja havaitun annosvasteen luonne. Näitä ja muita huomionarvoisia seikkoja käsitellään yksityiskohtaisesti lähteessä (4).
33. Kun tietoja kerätään erikseen kustakin hiirestä, tietojen perusteella voidaan analysoida tilastollisesti mahdollista annosvasteen olemassaoloa ja sen voimakkuutta. Tilastoanalyysissä voidaan muun muassa arvioida annos-vastesuhdetta ja tehdä asianmukaisesti mukautettuja vertailuja testiryhmillä (esimerkiksi pareittain annoksen saaneen ryhmän vertailu samaan aikaan tehtyyn liuotin-/kantaja-ainekontrolliryhmään). Tilastollisina analyysinä voidaan käyttää esimerkiksi lineaarista regressiota tai Williamsin testiä, joilla arvioidaan annos-vasteen suuntauksia, sekä Dunnettin testiä, jolla pareja vertaillaan toisiinsa. Tutkijan on otettava asianmukaisen tilastoanalyysimenetelmän valinnassa huomioon varianssin mahdolliset erot ja muut vastaavat ongelmat, jotka saattavat edellyttää määrittämis- ja muuntamistulosten tai non-parametrista tilastoanalyysia. Joka tapauksessa tutkijan on mahdollisesti tehtävä SI-laskelmia ja tilastoanalyysia sekä käyttäen tiettyjä määrittämissä koskevia tietoja (niin sanottu käyrän ulkopuolella olevat vasteet) että ilman niitä.

MITTAUSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

Mittaustulokset

34. Mittaustulokset on esitettävä taulukkona, josta käyvät ilmi eläinkohtaiset RLU-arvot, ryhmän eläinkohtaisten RLU-arvojen keskiarvo, siihen liittyvä virhetermi (esimerkiksi keskihajonta tai keskiarvon keskivirhe) sekä kunkin annosryhmän keskimääräinen SI samanaikaiseen liuotin-/kantaja-ainekontrolliryhmään verrattuna.

Testiraportti

35. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testi- ja kontrollikemikaalit

- tunnistetiedot (esimerkiksi CAS- ja EC-numerot, jos tiedossa; alkuperä, puhtaus, tunnetut epäpuhtaudet, eränumero),
- fysikaalinen olomuoto ja fysikaaliskemialliset ominaisuudet (esimerkiksi haihtuvuus, stabiilisuus, liukoisuus),
- jos kyseessä on seos, sen koostumus ja ainesosien suhteelliset osuudet.

Liuotin/kantaja-aine

- tunnistetiedot (puhtaus, tarvittaessa konsentraatio, käytetty tilavuus),
- perustelut kantaja-aineen valinnalle.

Koe-eläimet

- CBA-hiirten alkuperä,
- eläinten mikrobiologinen tila, jos se on tiedossa,
- eläinten määrä ja ikä,
- eläinten alkuperä, koe-eläintilat, ruokavalio ja niin edelleen.

Testiolosuhteet

- ATP-määrittyskitin alkuperä, eränumero ja valmistajan laadunvarmistus-/laadunvalvontatiedot,
- tiedot testiaineen valmistelusta ja annostelusta,
- perustelut annostasojen valinnalle (mukaan luettuina kartoitustestin tulokset, jos sellainen on tehty),
- käytetyt kantaja- ja testiaineiden konsentraatiot ja annostellun testiaineen kokonaismäärä,
- tiedot ravinnon ja veden laadusta (mukaan luettuina ruokavalion tyyppi/alkuperä, veden alkuperä),
- tiedot käsittely- ja näytteenottoaikatauluista,
- toksisuuden määrittämenetelmät,
- tulosten positiivisuuden tai negatiivisuuden arviointiperusteet,
- tiedot tutkimussuunnitelmasta poikkeamisesta ja selvitys siitä, miten poikkeaminen vaikuttaa tutkimuksen suunnitteluun ja tuloksiin.

Luotettavuuden tarkistus

- yhteenveto viimeisimmän luotettavuustarkistuksen tuloksista, mukaan luettuina tiedot käytetystä testiaineesta, konsentraatiosta ja kantaja-aineesta,

- testauslaboratorion samanaikaisesti ja/tai aiemmin tehtyjen positiivisten ja samanaikaisesti tehtyjen negatiivisten (liuotin/kantaja-aine) kontrollien tulokset,
- jos mukana ei ollut samanaikaista positiivista kontrollia, viimeisimmän yksittäisen positiivisen kontrollin päivämäärä ja laboratorioraportti sekä yksityiskohtainen selvitys laboratorion aiemmista positiivista kontrollia koskevista tiedoista, joiden perusteella positiivista kontrollia ei tarvitse tehdä joka kerta.

Tulokset

- kunkin hiiren paino annostelun alussa ja aikataulun mukaisen lopettamisen yhteydessä sekä kunkin annosryhmän keskimääräinen ja asiaan liittyviin muuttujiin liittyvä virhetermi (esimerkiksi keskihajonta tai keskiarvon keskivirhe),
- toksisuuden ilmeneminen ajan funktiona ja toksisuuden merkit, mukaan luettuna annostelualueen ihoärsytys, jos sellaista esiintyy, erikseen kullekin eläinyksilölle,
- eläinten lopettamisen ja ATP-mittauksen ajankohta kunkin eläimen osalta,
- taulukko yksittäisten hiirten RLU-arvoista ja SI-arvoista kunkin käsitellyn annosryhmän osalta,
- kunkin käsittelyryhmän hiirikohtaisen RLU-arvon keskimääräinen virhetermi ja asiaan liittyviin muuttujiin liittyvä virhetermi (esimerkiksi keskihajonta ja keskiarvon keskivirhe) sekä käyrän ulkopuolella olevien vastaiden analyysin tulokset kullekin käsittelyryhmälle,
- laskettu SI ja asianmukaisesti määritetty vaihteluväli, jossa otetaan huomioon eläintenvälinen vaihtelu sekä testiaineella että kontrolliaineella käsitellyissä ryhmissä,
- annos-vastesuhde,
- tarvittaessa tilastoanalyysit.

Tulosten pohdinta

- tulosten lyhyt kommentointi, annos-vasteanalyysi ja tarvittaessa tilastoanalyysit sekä johtopäätös siitä, voidaananko testiainetta pitää ihoherkistystä aiheuttavana.

LÄHDELUETTELO

- (1) OECD (2010). *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- (2) Chamberlain, M. ja Basketter, D. A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol.* 34, s. 999–1002.
- (3) Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Kimber, I. ja Loveless, S. E. (1996). The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.* 34, s. 985–997.
- (4) Basketter, D. A., Gerberick, G. F. ja Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.* 36, s. 327–333.
- (5) Van Och, F. M. M., Slob, W., De Jong, W. H., Vandebriel, R. J. ja Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.* 146, s. 49–59.
- (6) ICCVAM (1999). The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH-julkaisunumero 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf
- (7) Dean, J. H., Twerdok, L. E., Tice, R. R., Sailstad, D. M., Hattan, D. G., Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, s. 258–273.

- (8) Haneke, K. E., Tice, R. R., Carson, B. L., Margolin, B. H. ja Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, a. 274–286.
- (9) Sailstad, D. M., Hattan, D., Hill, R. N. ja Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, s. 249–257.
- (10) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd, based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH-julkaisunumero 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm>
- (11) ICCVAM (2009). Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf.
- (12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. ja Ito, M. (2008). Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* 58, s. 1–10.
- (13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. ja Yuasa, A. (2008). Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* 58, s. 11–26.
- (14) OECD (1992). *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- (15) Kreiling, R., Hollnagel, H. M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M. S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. ja Wendel, A. (2008). Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.* 46, s. 1896–1904.
- (16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J. C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. ja Mehling, A. (2009). Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 55, s. 90–96.
- (17) Crouch, S. P., Kozlowski, R., Slater, K. J. ja Fletcher, J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.* 160, s. 81–88.
- (18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. ja Matsumoto, S. (1984). Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth.* 72, s. 127–132.
- (19) Dexter, S. J., Cámara, M., Davies, M. ja Shakesheff, K. M. (2003). Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.* 24, s. 27–34.
- (20) Lundin, A. (2000). Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol.* 305, s. 346–370.
- (21) ILAR (1996). Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7. painos. Washington, DC: National Academies Press.
- (22) ICCVAM (2009). Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH-julkaisunumero 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStd.pdf
- (23) McGarry, H. F. (2007). The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.* 238, s. 71–89.
- (24) Kimber, I., Dearman, R. J., Scholes, E. W. ja Basketter, D. A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.* 93, s. 13–31.
- (25) OECD (2002). *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

- (26) Reeder, M. K., Broomhead, Y. L., DiDonato, L. ja DeGeorge, G. L. (2007). Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist* 96, s. 235.
- (27) ICCVAM (2009). Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fdLLNA/BRDcomplete.pdf>.
- (28) Hayes, B. B., Gerber, P. C., Griffey, S. S. ja Meade, B. J. (1998). Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.* 21, s. 195–206.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H. C., Ruzicka, T., Ahr, H. J., Lehmann, P. ja Vohr, V. W. (1998). An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 153, s. 83–94.
- (30) Woolhiser, M. R., Hayes, B. B. ja Meade, B. J. (1998). A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.* 8, s. 245–256.
- (31) Hayes, B. B. ja Meade, B. J. (1999). Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug. Chem. Toxicol.* 22, s. 491–506.
- (32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A. O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. ja Vohr, H. W. (2005). A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.* 212, s. 60–68.
- (33) Vohr, H. W. ja Ahr, H. J. (2005). The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.* 79, s. 721–728.
- (34) Patterson, R. M., Noga, E. ja Germolec, D. (2007). Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect.* 115, s. 1023–1028.
- (35) ICCVAM (2009). Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acuteTox/Tox_workshop.htm
- (36) OECD (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- (37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Basketter, D. A., Lea, L., House, R. V., Ladies, G. S., Loveless, S. E. ja Hastings, K. L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health* 53, s. 563–79.
- (38) OECD (2005). *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksytyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssia) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (38).

Vertailuaine: Herkistävä tai muu kuin herkistävä aine, jota käytetään testiaineen vertailustandardina. Vertailuaineella on oltava seuraavat ominaisuudet: i) luotettava alkuperä, joka pysyy samana, ii) samanlainen rakenne ja toiminta kuin testiaineryhmällä, iii) tunnetut fysikaaliskemialliset ominaisuudet, iv) todisteet tunnetuista vaikutuksista ja v) tunnettu voimakkuus tavoitellulla vasteen vaihteluvälillä.

Väärä negatiivinen: Aine on testimenetelmässä määritetty väärin perustein negatiiviseksi tai inaktiiviseksi, vaikka se itse asiassa on positiivinen tai aktiivinen.

Väärä positiivinen: Aine on testimenetelmässä määritetty väärin perustein positiiviseksi tai aktiiviseksi, vaikka se itse asiassa on negatiivinen tai inaktiivinen.

Vaarallisuus: Mahdollisuus kielteiseen terveys- tai ympäristövaikutukseen. Kielteinen vaikutus edellyttää altistumista vähintään tietyllä tasolla.

Laboratoriodenvälinen uusittavuus: Se, missä määrin eri (pätevät) laboratoriot voivat saada aikaan laadullisesti ja määrällisesti samanlaisia tuloksia käyttämällä samoja tutkimussuunnitelmia ja testaamalla samoja testiaineita. Laboratoriodenvälinen uusittavuus määritetään esivalidointi- ja validointimenettelyissä, ja se osoittaa, missä määrin testi voidaan onnistuneesti toteuttaa eri laboratorioissa (38).

Laboratorionsisäinen uusittavuus: Se, missä määrin pätevä laboratoriohenkilöstö voi (kyseisessä laboratoriossa) saada onnistuneesti aikaan samat tulokset käyttämällä tiettyä tutkimussuunnitelmaa eri ajankohtina (38).

Käyrän ulkopuolella oleva vaste: Käyrän ulkopuolella olevalla vasteella tarkoitetaan havaintoa, joka poikkeaa merkittävästi muista populaation sattumanvaraisten näytteiden arvoista.

Laadunvarmistus: Hallintomenettely, jossa testausta suorittavista henkilöistä riippumattomat henkilöt arvioivat laboratorion testausstandardien, vaatimusten ja kirjanpitoimenettelyjen noudattamista ja tiedonsiirron tarkkuutta.

Luotettavuus: Laajuus, jolla testimenetelmä on uusittavissa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa pidemmällä aikavälillä käytettäessä samaa tutkimussuunnitelmaa. Luotettavuus arvioidaan laskemalla laboratorionsisäinen ja laboratoriodenvälinen uusittavuus (38).

Ihoherkistys: Immunologinen prosessi, joka aiheutuu herkän yksilön paikallisesta altistamisesta tietyille kemialliselle allergeenille, joka aiheuttaa iholla immuunivasteen, joka voi johtaa kosketusherkistykseen.

Stimulaatioindeksi (SI): Testiaineen ihoärsytyspotentiaalin arvioimiseksi laskettu arvo, jolla esitetään käsiteltyjen ryhmien soluproliferaation ja samanaikaisesti kantaja-aineella käsitellyn kontrolliryhmän soluproliferaation välinen suhde.

Testiaine (testikemikaali): Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

B.51. IHOHERKISTYS: PAIKALLINEN IMUSOLMUKEMÄÄRITYSMENETELMÄ: BRDU-ELISA

JOHDANTO

1. Kemikaalien testausta koskevia OECD:n suuntaviivoja ja EU:n testimenetelmiä tarkistetaan säännöllisesti tieteellisen kehityksen, muuttuvien sääntelytarpeiden ja eläinten hyvinvointiin liittyvien kysymysten perusteella. Ensimmäinen, hiirten ihoherkistykseen määrittämisessä käytettävä testimenetelmä (B.42) eli paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä (Local Lymph Node Assay, LLNA; OECD:n testiohje 429) on tarkistettu (1 ja tämän liitteen B.42 luku). LLNA-menetelmän validointia koskevat yksityiskohtaiset tiedot ja yleiskatsaus siihen liittyneestä työstä on julkaistu (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). LLNA-menetelmässä lymfositien proliferaatio määritetään radioisotoopilla leimatus tyymiiniin tai jodin avulla. Siksi määrittäminen käytetään rajoitettuihin tapauksiin, joissa radioaktiivisten aineiden hankkiminen, käyttö tai hävittäminen on ongelmallista. LLNA: BrdU-ELISA (entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritysmenetelmä) on LLNA-testimenetelmän muunnos, jossa ei käytetä radioisotooppeja ja jossa lymfositien proliferaatio määritetään ELISA-testijärjestelmässä käyttämällä ei-radioaktiivisesti merkattua 5-bromi-2-deoksiuridiiniä (BrdU) (CAS-numero 59-14-3). Kansainvälinen riippumaton tieteellinen vertaisarviointityöryhmä on arvioinut LLNA: BrdU-ELISA -testimenetelmän, validoinut sen ja katsonut, että sillä voidaan määrittää ihoa herkistäviä ja muita kuin herkistäviä kemikaaleja tietyin rajoituksin (10) (11) (12). Tämä testimenetelmä on suunniteltu kemikaalien (aineiden ja seosten) ihoherkistyspotentiaalin arvioimiseen eläimillä. Tämän liitteen B.6 luvussa ja OECD:n testiohjeessa 406 käytetään marsutestejä, erityisesti marsuilla tehtävää maksimointitestiä ja Bühlerin testiä (13). LLNA-menetelmällä (tämän liitteen B.42 luku; OECD:n testiohje 429) ja sen kahdella muuhun kuin radioaktiivisuuteen perustuvalla mukautuksella eli LLNA: BrdU-ELISA -menetelmällä (tämän liitteen B.51 luku; OECD:n testiohje 442 B) ja LLNA: DA -menetelmällä (tämän liitteen B.50 luku; OECD:n testiohje 442 A) voidaan kaikilla vähentää testeihin käytettävien eläinten määrää. Näin ollen ne ovat eläinten käytön osalta edistyneempiä kuin B.6 luvussa ja OECD:n testiohjeessa 406 (13) tarkoitettut marsutestit.

2. Kuten LLNA-menetelmässä, myös LLNA: BrdU-ELISA -menetelmässä tutkitaan ihoherkistykseen induktiovaihetta ja tuotetaan annosvasteen arviointiin sopivia kvantitatiivisia tuloksia. Koska ihoa herkistäviä aineita voidaan tunnistaa ilman radioaktiivista DNA-merkkiainetta, työssä ei altistuta radioaktiivisuudelle, eikä jätteiden hävittäminen aiheuta ongelmia. Tämä voi johtaa hiirten entistä yleisempään käyttöön ihoa herkistävien aineiden tunnistamisessa, millä puolestaan vähennetään entisestään marsujen käyttämistä ihoherkistyspotentiaalain testauksessa (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406) (13).

MÄÄRITELMÄT

3. Sovellettavat määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

JOHDANTO JA RAJOITUKSET

4. LLNA: BrdU-ELISA -menetelmä on mukautettu LLNA-menetelmä mahdollisten ihoa herkistävien kemikaalien tunnistamiseksi tietyin rajoituksin. Tämä ei välttämättä merkitse sitä, että LLNA: BrdU-ELISA -menetelmää pitäisi käyttää kaikissa tapauksissa LLNA-menetelmän tai marsutestin asemesta (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406) (13), vaan pikemminkin sitä, että määritysmenetelmä on yhtä hyvä ja sitä voidaan käyttää vaihtoehtona, jossa positiivisia ja negatiivisia tuloksia ei yleensä enää tarvitse varmistaa uudelleen (10) (11). Testilaboratorion on otettava huomioon kaikki testiaineesta saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen tekemistä. Tällaisia tietoja ovat muun muassa testiaineen tunnistetiedot ja kemiallinen rakenne, sen fysikaaliskemialliset ominaisuudet, muiden aineella tehtyjen *in vitro*- tai *in vivo*-myrkyllisyystestien tulokset sekä rakenteellisesti samankaltaisten kemikaalien toksikologiset tiedot. Tietojen perusteella on määritettävä, voidaanko LLNA: BrdU-ELISA -menetelmää käyttää kyseisen aineen testaamiseen (ottaen huomioon, että LLNA: BrdU-ELISA -menetelmä ei sovellu tiettyjen kemikaalilyyppien testaamiseen (katso 5 kohta)) ja mitä annosta on käytettävä.
5. LLNA: BrdU-ELISA on *in vivo*-menetelmä, joten sen käyttö ei merkitse koe-eläinten käytön loppumista kosketusherkistykseen arvioinnissa. Sillä voidaan kuitenkin vähentää tähän tarkoitukseen käytettävien eläinten määrää marsutesteihin verrattuna (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406) (13). LLNA: BrdU-ELISA -menetelmässä käytetty tapa testata kosketusherkistystä eläimillä on myös huomattavasti edistyneempi, koska toisin kuin B.6 menetelmässä ja OECD:n testiohjeessa 406, LLNA: BrdU-ELISA -menetelmässä ei edellytetä tarkoituksellista ihon yliherkyyssreaktioiden tuottamista. LLNA: BrdU-ELISA -menetelmä ei myöskään edellytä adjuvantin käyttöä, toisin kuin marsuilla tehtävä maksimointitesti (tämän liitteen B.6 luku, 13). Näin ollen LLNA: BrdU-ELISA -menetelmällä vähennetään eläinten kärsimystä. Vaikka LLNA: BrdU-ELISA -menetelmä onkin tietyllä tasolla edistyneempi kuin B.6 menetelmä tai OECD:n testiohje 406 (13), siihen liittyy tiettyjä rajoituksia, joiden vuoksi voi olla tarpeen käyttää B.6 menetelmää tai OECD:n testiohjetta 406 (esimerkiksi tiettyjen metallien testaus, väärät positiiviset löydökset joidenkin ihoa ärsyttävien aineiden, esimerkiksi pinta-aktiivisten aineiden osalta (6) (1 ja tämän liitteen B.42 luku) tai testiaineen liukoisuus). Häiritseviä (15) funktionaalisia ryhmiä sisältävien kemikaaliluokkien tai aineiden yhteydessä voi olla tarpeen käyttää marsutestejä (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406 (13)). LLNA-menetelmälle asetettuja rajoituksia (1 ja tämän liitteen B.42 luku) on sovellettava myös LLNA: BrdU-ELISA -menetelmään (10). Tällaisia tunnistettuja rajoituksia lukuun ottamatta mitä tahansa kemikaaleja pitäisi voida testata LLNA: BrdU-ELISA -menetelmällä, elleivät kyseisten kemikaalien ominaisuudet vaikuta LLNA: BrdU-ELISA -menetelmän tarkkuuteen. Myös positiivisten rajatulosten mahdollisuus on otettava huomioon, kun saadaan stimulaatioindeksiksi (SI) 1,6–1,9 (katso 31–32 kohta). Tämä perustuu 43 aineen validointitietokantaan, jossa aineiden SI $\geq 1,6$ (katso 6 kohta) ja jossa LLNA: BrdU-ELISA -menetelmällä on tunnistettu oikein kaikki 32 herkistystä aiheuttavaa LLNA-ainetta mutta tunnistettu väärin kaksi niistä 11 muusta kuin herkistystä aiheuttavasta LLNA-aineesta, joiden SI-arvo on 1,6–1,9 (positiivinen rajatulos) (10). Koska samaa tulosjoukkoa on käytetty SI-arvojen määrittämiseen ja testin ennakoivien ominaisuuksien laskemiseen, esitetyissä tuloksissa voidaan yliarvioida todellisia ennakoivia ominaisuuksia.

TESTIMENETELMÄN PERIAATE

6. LLNA: BrdU-ELISA -menetelmän peruseriaate on, että ihoa herkistävät aineet aiheuttavat lymfosyyttien proliferaatiota imusolmukkeissa, jotka dreneeraavat testiaineen annostelualueen. Tämä proliferaatio on suhteessa käytettyyn annokseen ja allergeenin voimakkuuteen ja tarjoaa yksinkertaisen keinon ihoherkistykseen mittaamiseksi kvantitatiivisella tavalla. Proliferaatio mitataan vertaamalla kussakin testiryhmässä tapahtuvaa keskimääräistä soluproliferaatiota kantaja-aineella käsitellyssä kontrolliryhmässä tapahtuvaan keskimääräiseen soluproliferaatioon. Kunkin testiryhmän keskimääräisen soluproliferaation ja sitä vastaavan kontrolliryhmän keskimääräisen soluproliferaation suhde (SI) määritetään, ja sen on oltava yhtä suuri tai suurempi kuin 1,6, jotta testiaineen mahdollista ihoherkistyspotentiaalia olisi syytä arvioida tarkemmin. Tässä kuvatut menetelmät perustuvat korvalehden dreneeraavien imusolmukkeiden solujen lisääntymisen määrittämiseen BrdU-pitoisuuden mittaamisen avulla. BrdU on tymidiinin analogi ja inkorporoituu lisääntyvien solujen DNA:han samalla tavalla. BrdU:n inkorporoitumista mitataan ELISA-menetelmällä, jossa käytetään BrdU-spesifistä vasta-ainetta, joka leimataan myös peroksidaasilla. Kun lisätään peroksidaasi-entsyymiin substraatti, peroksidaasi reagoi substraatin kanssa ja muodostaa värillisen tuotteen, jonka määrä määritetään mittaamalla absorbanssi tietyllä aallonpituudella käyttämällä kuoppalevyjen lukulaitetta.

MÄÄRITYSMENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

7. Tähän testiin paras eläinlaji on hiiri. LLNA: BrdU-ELISA -määritysmenetelmän validointitutkimukset on tehty yksinomaan CBA/JN-kannalla, joten sen käyttöä suositellaan (10) (12). Määritysmenetelmässä käytetään nuoria täysikasvuisia naarashiiriä, jotka eivät ole poikineet eivätkä ole tiineenä. Testin alussa eläinten on oltava 8–12 viikon ikäisiä, ja eläinten painoerojen on oltava vähäisiä eli enintään 20 prosenttia keskipainosta. Muita kantoja tai uroseläimiä voidaan käyttää, jos tietoja tuotetaan riittävästi sen osoittamiseksi, että LLNA: BrdU-ELISA -vasteessa ei esiinny merkitseviä koe-eläinkantaan tai sukupuoleen liittyviä eroja.

Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta

8. Hiiret on pidettävä yhteishäkeissä (16), ellei hiirien pitämiseksi erillisissä häkeissä esitetä riittäviä tieteellisiä perusteluja. Koe-eläintilan lämpötilan on oltava 22 ± 3 celsiusastetta. Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70 prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, on kuitenkin pyrittävä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa on käytettävä keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa.

Eläinten valmistelu

9. Eläimet valitaan satunnaistetusti, merkitään niin, että yksilöt voidaan erottaa toisistaan (ei kuitenkaan korvamerkeillä), ja pidetään häkeissä vähintään viiden päivän ajan ennen testiaineen annostelun aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-olosuhteisiin. Ennen käsittelyn alkua kaikki eläimet on tutkittava sen varmistamiseksi, ettei niillä ole havaittavia ihovaurioita.

Annosteluliusten valmistelu

10. Kiinteät kemikaalit on liuotettava tai sekoitettava liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja tarvittaessa laimennettava ennen niiden annostelua hiiren korvaan. Nestemäiset kemikaalit voidaan annostella laimentamattomana tai ennen annostelua laimennettuina. Liukenemattomia kemikaaleja, kuten lääkinnällisissä laitteissa yleisesti käytettyjä kemikaaleja, on pyrittävä uuttamaan erittäin voimakkaasti asianmukaiseen liuottimeen, jotta kaikki uuttuvat ainesosat tulisivat esiin ennen annostelua hiirten korviin. Testiaineet on valmistettava päivittäin, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiiliteettitutkimuksilla.

Luotettavuuden tarkistus

11. Positiivisia kontrollikemikaaleja käytetään, jotta voidaan osoittaa määritysmenetelmän toimivuus. Herkistystesteissä käytettävän aineen vasteena on menetelmässä saatava aikaan riittävä ja toistettavissa oleva herkistyminen, jonka vastetaso on aineelle tyypillinen. Positiivisen kontrollikemikaalin käyttöä testissä samanaikaisesti testikemikaalin kanssa suositellaan, koska sillä osoitetaan, että laboratoriolle on riittävä pätevyys kuhunkin määritysmenetelmään, ja sen avulla voidaan arvioida laboratorionsisäistä ja laboratoriodenvälistä uusittavuutta ja vertailtavuutta. Myös tietyt sääntelyviranomaiset vaativat positiivisten kontrollikemikaalien käyttämistä kaikissa tutkimuksissa. Käyttäjien olisikin otettava yhteyttä asiasta vastaaviin viranomaisiin ennen LLNA: BrdU-ELISA -määritysmenetelmän käyttöönottoa. Tämän takia suositellaan positiivisen kontrollikemikaalin käyttöä samanaikaisesti rutiininomaisesti, jotta ei tarvitsisi uusia eläinkokeita sellaisten vaatimusten täyttämiseksi, jotka johtuvat siitä, että positiivista kontrollikemikaalia käytetään vain ajoittain (katso 12 kohta). Positiivisen kontrollikemikaalin on tuotettava positiivinen LLNA: BrdU-ELISA -vaste altistustasolla, jonka odotetaan antavan stimulaatioindeksin, joka on yhtä suuri tai suurempi kuin 1,6 verrattuna negatiiviseen kontrolliryhmään. Positiivisen kontrollikemikaalin annostaso on valittava siten, että se ei aiheuta liian voimakasta ihoärsytystä tai koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja että induktio on toistettavissa mutta ei liian suuri (esimerkiksi $SI > 14$ on liian suuri). Suositeltavia positiivisia kontrollikemikaaleja ovat 25-prosenttinen heksyylikanelialdehydi (CAS-numero 101-86-0) ja 25-prosenttinen eugenoli (CAS-numero 97-53-0) asetonin ja oliiviöljyn seoksessa (4:1 v/v). Joissakin olosuhteissa voidaan riittävin perustein käyttää muita positiivisia kontrollikemikaaleja, jotka täyttävät edellä mainitut kriteerit.
12. Vaikka samanaikaisen positiivisen kontrolliryhmän käyttöä suositellaan, joissakin tapauksissa positiivisen kontrollikemikaalin ajoittainen testaus (enintään kuuden kuukauden välein) voi riittää LLNA: BrdU-ELISA -menetelmää säännöllisesti käyttävissä laboratorioissa (eli sellaisissa, jotka käyttävät LLNA: BrdU-ELISA -menetelmää vähintään kerran kuukaudessa) ja joilla on aiempia positiivisen kontrollikemikaalin määritystietoja, jotka osoittavat laboratorion valmiuden saada aikaan uusittavissa olevia ja täsmällisiä tuloksia positiivisilla kontrollikemikaaleilla. Riittävä LLNA: BrdU-ELISA -menetelmää koskeva pätevyys voidaan osoittaa tuottamalla positiivisella kontrollikemikaalilla toistuvasti samantasoisia positiivisia tuloksia vähintään kymmenessä riippumattomassa testissä, jotka suoritetaan kohtuullisen ajanjakson kuluessa (alle yhden vuoden aikana).
13. Samanaikaista positiivista kontrollikemikaalia on käytettävä aina, kun LLNA: BrdU-ELISA -menettelyä muutetaan (esimerkiksi kun koulutettu henkilökunta vaihtuu, testimenetelmän materiaalit ja/tai reagenssit vaihtuvat, testimenetelmässä käytettävät laitteet vaihtuvat tai koe-eläinten alkuperä vaihtuu), ja tällaiset muutokset on kirjattava laboratorioraportteihin. Muutosten vaikutusta aiemmin saatujen aiempien määritystietojen asianmukaisuuteen on tarkasteltava, jotta voidaan päättää, onko kerättävä uusi määritystietokanta positiivisen kontrollikemikaalin tulosten yhdenmukaisuuden osoittamiseksi.

14. Tutkijoiden on otettava huomioon, että jos positiivisen kontrollikemikaalin tutkimusta ei suoriteta samanaikaisesti vaan vain ajoittain, positiivisen kontrollikemikaalin kunkin säännöllisen tutkimuksen välillä ilman vastaavaa positiivista kontrollikemikaalia aikaan saatujen negatiivisten tutkimustulosten asianmukaisuus ja hyväksyttävyyys voivat vaarantua. Jos esimerkiksi saadaan väärä negatiivinen tulos, kun positiivinen kontrolli ei ole ollut aina samanaikaisesti mukana, positiivisen kontrollikemikaalin viimeisen hyväksytyt yksittäisen tutkimuksen ja positiivisen kontrollikemikaalin hylätyn yksittäisen tutkimuksen tuloksen välisenä aikana saadut testiaineen negatiiviset tulokset voivat olla kyseenalaisia. Näiden tulosten seurauksia on tarkasteltava huolellisesti päätettäessä positiivisten kontrollikemikaalien käyttämisestä aina testiaineen rinnalla tai vain ajoittain. Lisäksi on huomioitava, että testiaineen rinnalla käytettävää positiivista kontrolliryhmää varten olisi käytettävä vähemmän eläimiä, jos se on tieteellisesti perusteltua ja jos laboratorio osoittaa laboratoriokohtaisten aiempien tietojen perusteella, että hiiriä voidaan käyttää vähemmän (17).
15. Vaikka positiiviset kontrollikemikaalit on testattava kantaja-aineessa, jonka tiedetään antavan aina samanlaisen vasteen (esimerkiksi asetoniooliöljy, 4:1 v/v), joidenkin säännösten mukaan testaus muussa kuin standardikantaja-aineessa (kliinisesti/kemiallisesti relevantissa aineessa) saattaa myös olla tarpeen (18). Jos samanaikaista positiivista kontrollikemikaalia testataan eri kantaja-aineessa kuin testiainetta, sitä varten on käytettävä erillistä kantaja-aineella käsiteltyä kontrollia.
16. Arvioitaessa tiettyyn kemikaaliluokkaan kuuluvia tai tietyn vastetason aikaansaavia testiaineita vertailuaineilla voidaan myös osoittaa, että testimenetelmä toimii asianmukaisesti, kun halutaan osoittaa tämällytyppisten testiaineiden ihoherkistyspotentiaali. Vertailuaineilla olisi silloin oltava seuraavat ominaisuudet:
- samanlainen rakenne ja toiminta kuin testattavalla aineryhmällä
 - tunnetut fysikaalis-kemialliset ominaisuudet
 - sopivuutta tukevia tietoja LLNA: DA -menetelmästä
 - sopivuutta tukevia tietoja muista eläinmalleista ja/tai ihmisistä.

TESTIMENETTELY

Koe-eläinten määrä ja annostasot

17. Kussakin annostasoryhmässä on oltava vähintään neljä eläintä, ja testiaineesta on käytettävä vähintään kolmea konsentraatiota. Lisäksi käytetään negatiivista kontrolliryhmää, joka käsitellään vain testiaineen kantaja-aineella, sekä positiivista kontrolliryhmää (joka määritetään samanaikaisesti tai joka on määritetty hiljattain, laboratorion toimintatavan mukaisesti, ottaen huomioon 11–15 kohdat). Positiivisesta kontrolliryhmästä on tarvittaessa testattava useita annoksia, etenkin jos positiivista kontrollikemikaalia testataan epäsäännöllisesti. Kontrolliryhmän eläimiä on kohdeltava samalla tavoin kuin testiryhmän eläimiä, paitsi että niitä ei käsitellä testiaineella.
18. Annostason ja kantaja-aineen valinnan on perustuttava lähteissä 2 ja 19 esitettyihin suosituksiin. Peräkkäiset annostasot valitaan yleensä sopivasta konsentraatiosarjasta, esimerkiksi sarjasta 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % ja niin edelleen. Käytettävälle konsentraatiosarjalle on esitettävä asianmukaiset tieteelliset perustelut. Kaikki käytettävissä olevat toksikologiset tiedot (esimerkiksi akuutti toksisuus ja ihoärsytys) ja rakenteelliset ja fysikaaliskemialliset tiedot kyseisestä testiaineesta (ja/tai rakenteellisesti vastaavista aineista) on tarvittaessa otettava huomioon kolmen peräkkäisen konsentraation valinnassa niin, että suurin konsentraatio edustaa maksimialtistusta, mutta koko elimistöön kohdistuva toksisuus ja/tai liian voimakas paikallinen ihoärsytys kuitenkin vältetään (19) (20 ja tämän liitteen B.4 luku). Jos tällaisia tietoja ei ole käytettävissä, testiä edeltävä kartoitus voi olla tarpeen (katso 21–24 kohta).
19. Kantaja-aine ei saa vaikuttaa testituloksiin tai vääristää niitä. Se on valittava siten, että testiaine liukenee siihen mahdollisimman helposti ja aineen konsentraatio annosteluun sopivassa liuoksessa tai suspensiossa on mahdollisimman suuri. Suositeltavat kantaja-aineet ovat asetoniooliöljy (4:1 v/v), N,N-dimetyyliformamidi, metyylietyyliketoni, propyleeniglykoli ja dimetyylisulfoksidi (6), mutta muitakin kantaja-aineita voidaan käyttää riittävän tieteellisin perustein. Joissakin tilanteissa voi olla tarpeen käyttää lisäkontrolliaineena kliinisesti perusteltua liuotinta taikka kaupallista valmistetta, jona testiainetta markkinoidaan. Erityisesti on varmistettava, että hydrofiiliset testiaineet sisällytetään sellaiseen kantaja-ainejärjestelmään, joka vettää ihon eikä valu heti pois, lisäämällä asianmukaisia liukenemista edistäviä aineita (esimerkiksi 1-prosenttinen Pluronic® L92). Pelkkiä vesiliuoksia on siis syytä välttää.
20. Prosessoimalla yksittäisten hiirten imusolmukkeita voidaan arvioida eläintenvälistä vaihtelua ja vertailla tilastollisesti testiaineen ja kantaja-aineella käsitellyn ryhmän tuloksia (katso 33 kohta). Positiivisen kontrolliryhmän hiirten määrän vähentäminen voi olla mahdollista, mutta vain siinä tapauksessa, että tietoja kerätään yksittäisistä eläimistä (17). Tietty sääntelyviranomaiset vaativat, että tietoja on kerättävä yksittäisistä eläimistä. Yksittäisiä eläimiä koskevien tietojen keräämisellä edistetään eläinten hyvinvointia, koska siten vältetään päällekkäiset testaukset, jotka ovat tarpeen, jos sääntelyviranomaisten on tarkasteltava tietyllä tavalla (esimerkiksi eläimistä saatuja mittaustietoja yhdistämällä) saatuja testiainetuloksia myöhemmin muiden vaatimusten (esimerkiksi yksittäisiä eläimiä koskevat tiedot) perusteella.

Testiä edeltävä kartoitus

21. Jos suurimman testattavan annoksen määrittämiseksi ei ole saatavilla tietoja (katso 18 kohta), on testiä ennen kartoitettava LLNA: BrdU-ELISA -menetelmän testeissä käytettävä asianmukainen annostasos. Siten autetaan ensimmäisannoksen valinnassa varsinaista LLNA: BrdU-ELISA -tutkimusta varten, kun tietoja koko elimistöön kohdistuvan toksisuuden (katso 24 kohta) ja/tai liian voimakkaan paikallisen ihoärsytyksen (katso 23 kohta) aiheuttavasta konsentraatiosta ei ole saatavilla. Testattavan ensimmäisannoksen tason on vastattava sadan prosentin pitoisuutta nestemäisen testiaineen osalta tai suurinta mahdollista konsentraatiota kiinteiden tai suspendoitujen aineiden osalta.
22. Testiä edeltävä kartoitus suoritetaan varsinaista LLNA: BrdU-ELISA -tutkimusta vastaavissa olosuhteissa, kuitenkin niin, että imusolmukkeiden soluproliferaatiota ei arvioida, ja kussakin annosryhmässä voidaan käyttää vähemmän eläimiä. Kussakin annosryhmässä olisi hyvä käyttää yhtä tai kahta eläintä. Kaikkia hiiriä tarkkaillaan päivittäin koko elimistöön kohdistuvan toksisuuden tai annostelukohdassa esiintyvän paikallisen ärsytyksen kliinisten merkkien havaitsemiseksi. Eläinten paino kirjataan ennen testaamista ja ennen eläinten lopettamista (päivä 6). Kunkin hiiren molemmista korvista tutkitaan eryteeman merkit, ja ne pisteytetään taulukon 1 mukaisesti (20 ja tämän liitteen B.4 luku). Korvan paksuus mitataan paksuusmittarilla (esimerkiksi digitaalisella mikrometrillä tai Peacock Dial -paksuusmittarilla) päivänä 1 (ennen annosta), päivänä 3 (noin 48 tunnin kuluttua ensimmäisestä annoksesta) ja päivänä 6. Päivänä 6 korvan paksuus voidaan myös määrittää mittaamalla korvan lävistämiseen tarvittava massa sen jälkeen, kun eläimet on lopetettu humanisti. Paikallinen ärsytys on erittäin voimakas, jos eryteemapisteytyksen arvo ≥ 3 ja/tai korvan paksuuntuminen ≥ 25 prosenttia minä tahansa mittauspäivänä (21) (22). Suurin varsinaiseen LLNA: BrdU-ELISA -tutkimukseen valittava annos on kartoitusta varten määritetyn konsentraatiosarjan (katso 18 kohta) suurin annos, joka ei enää aiheuta koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja/tai liian voimakasta paikallista ihoärsytystä.

Taulukko 1

Eryteemapisteytys

Havainto	Pisteet
Ei eryteemaa	0
Hyvin lievä eryteema (tuskin havaittava)	1
Selkeästi erottuva eryteema	2
Keskivakava–vakava eryteema	3
Vakava eryteema (voimakas punoitus)–karsta, joka estää eryteeman pisteytyksen	4

23. Sen lisäksi, että käytetään korvien paksuuden lisääntymistä yli 25 prosenttia (21) (22), myös tilastollisesti merkittävää käsiteltyjen hiirten korvan paksuuden kasvua kontrollihiiriin verrattuna on käytetty ärsyttävien aineiden määrittämiseksi LLNA-menetelmässä (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Vaikka tilastollisesti merkittävää kasvua voi esiintyä silloinkin, kun korva paksuuntuu alle 25 prosenttia, sen ei katsota liittyvän erityisesti hyvin voimakkaaseen ärsytykseen (25) (26) (27) (28) (29).
24. Seuraavat kliiniset havainnot voivat yhdennetyn arvioinnin osana olla osoituksena koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta (30) ja voivat näin ollen olla osoituksena suurimmasta annostasosta, jota varsinaisessa LLNA: BrdU-ELISA -menetelmässä voidaan käyttää: muutokset hermoston toiminnassa (esimerkiksi karvojen jäykistyminen, ataksia, vapina ja kouristukset); muutokset käyttäytymisessä (esimerkiksi aggressiivisuus, muutokset turkin hoidossa, aktiivisuustason huomattava muuttuminen); muutokset hengityksessä (hengityksen säännöllisyyden ja syvyyden muutokset, kuten hengenahdistus, hengen haurastuminen ja rahina) sekä muutokset ravinnon ja veden kulutuksessa. Arvioinnissa on huomioitava myös letargian ja/tai passiivisuuden merkit, vähäistä tai hetkittäistä kipua suuremman kivun ja kärsimyksen mahdolliset kliiniset merkit tai eläimen painon yli viiden prosentin laskeminen päivästä 1 päivään 6 sekä kuolleisuus. Kuolevat eläimet tai eläimet, jotka osoittavat selviä merkkejä voimakkaasta kivusta ja kärsimyksestä, on lopetettava humanisti (31).

Varsinaisen tutkimuksen testiakataulu

25. Määritysmenetelmän aikataulu on seuraava:

- *Päivä 1:* Määritetään ja kirjataan kunkin koe-eläimen paino ja tehdään mahdollisia kliinisiä havaintoja. Kunkin korvan takaosaan annostellaan 25 µl testiainetta, kantaja-ainetta tai positiivisen kontrollikemikaalin (rinnakkaisen tai hiljattain tehdyn, laboratorion toimintatavan mukaisesti, ottaen huomioon 11–15 kohdat) sopivaa laimennosta.
- *Päivät 2 ja 3:* Toistetaan päivänä 1 toteutettu annostelu.
- *Päivä 4:* Ei käsittelyä.
- *Päivä 5:* Ruiskutetaan 0,5 ml (5 mg/hiiri) BrdU-liuosta (10 mg/ml) intraperitoneaalisesti.

- Päivä 6: Kirjataan kunkin koe-eläimen paino ja tehdään mahdollisia kliinisiä havaintoja. Noin 24 tunnin (24 h) kuluttua BrdU-injektiosta eläimet lopetetaan humanisti. Hiiren kummastakin korvasta leikataan irti dreneeraavat korvavalehdet imusolmukkeet, ja kunkin eläimen imusolmukkeet prosessoidaan erikseen fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa (PBS). Imusolmukkeiden tunnistukseen ja irrotukseen liittyvät tiedot ja kaaviot esitetään lähteessä (17). Paikallista ihovastetta voidaan seurata varsinaisessa tutkimuksessa tarkemmin niin, että tutkimussuunnitelmaan sisällytetään täydentäviä parametreja, kuten korvan eryteeman pisteytys tai korvan paksuutta koskevat mittaustulokset (saadaan joko paksuusmittarilla tai ruumiinavauksen yhteydessä tehtävillä korvan lävistämiseen tarvittavan massan mittauksilla).

Solususpensioiden valmistus

26. Kunkin hiiren imusolmukeparien soluista valmistetaan suspensio, jossa kaikki solut ovat irrallaan muista (yksisolususpensio), hajottamalla kudokset mekaanisesti painamalla se varovaisesti ruostumattoman terässeulan läpi (silmä-koko 200 µm) tai käyttämällä muuta yksisolususpension valmistamiseksi hyväksyttyä tekniikkaa (esimerkiksi käyttämällä kertakäyttöistä muovista survinta imusolmukkeiden murskaamiseen ja painamalla ne sitten nylonseulan läpi (silmäkoko 70)). Yksisolususpension valmistustapa on tässä määritysmenetelmässä erittäin tärkeä, ja menettely on opeteltava etukäteen. Negatiivisen kontrolliryhmän eläinten imusolmukkeet ovat pieniä, joten vaihe on suoritettava huolellisesti SI-arvoihin mahdollisesti vaikuttavien artefaktien välttämiseksi. Kussakin menettelyssä yksisolususpension tilavuus on saatettava määritetyn optimoidun tilavuuden mukaiseksi (noin 15 ml). Optimoitu tilavuus perustuu negatiivisen kontrolliryhmän keskimääräiseen absorbanssiin välillä 0,1–0,2.

Solujen proliferaation määrittäminen (lymfosyyttien DNA:n BrdU-pitoisuuden mittaaminen)

27. BrdU mitataan ELISA-menetelmällä käyttämällä kaupallisesti saatavilla olevaa välineistöä (esimerkiksi Roche Applied Science, Mannheim, Saksa, kataloginnumero 11 647 229 001). Tasapohjaisen kuoppalevyn kuoppiin lisätään 100 µl imusolmuke-solususpensiota kolmoismäärityksinä. Solususpension fiksaation ja denaturaation jälkeen jokaiseen kuoppaan lisätään anti-BrdU-vasta-aine ja sen annetaan reagoida. Tämän jälkeen anti-BrdU-vasta-aine poistetaan huuhtelemalla ja lisätään reaktion substraatti. Vapautuvan kromogeenin absorbanssi mitataan 370 nm:ssä ja 492 nm:n vertailuaallonpituudella. Määritysmenetelmän testiolosuhteet on kaikissa yhteyksissä optimoitu (katso 26 kohta).

HAVAINNOT

Kliiniset havainnot

28. Kustakin hiirestä on päivittäin havainnoitava huolellisesti mahdolliset kliiniset merkit joko annostelualueen paikallisesta ärsytyksestä tai koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta. Kaikki havainnot kirjataan järjestelmällisesti erikseen kustakin hiirestä. Seurantasuunnitelmassa on esitettävä myös perusteet, joiden avulla voidaan nopeasti tunnistaa hiiret, joissa havaitaan merkkejä koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta, liian voimakkaasta paikallisesta ihoärsytyksestä tai ihosyövyyttävydestä ja jotka on lopetettava (31).

Ruumiinpainot

29. Kuten 25 kohdassa todetaan, kukin eläin on punnittava erikseen testin alussa ja aikataulun mukaisesti humanin lopettamisen yhteydessä.

TULOsten LASKEMINEN

30. Kunkin käsittelyryhmän tulokset ilmoitetaan keskimääräisenä SI:nä. SI-arvo saadaan jakamalla testiaineryhmän ja positiivisen kontrolliryhmän hiirikohtaisista BrdU-merkki-indekseistä laskettu keskiarvo liuottimen/kantaja-aineen kontrolliryhmän vastaavalla tuloksella. Kantaja-ainekontrollien SI:n keskiarvo on 1.

BrdU-merkki-indeksi määritellään seuraavasti:

$$\text{BrdU-merkki-indeksi} = (\text{ABS}_{\text{em}} - \text{ABS}_{\text{blank}_{\text{em}}}) - (\text{ABS}_{\text{ref}} - \text{ABS}_{\text{blank}_{\text{ref}}})$$

jossa: em = emissioaallonpituus; ja ref = referenssiaallonpituus.

31. Tulokset katsotaan positiiviseksi, kun $SI \geq 1,6$ (10). Rajatuloksen (SI-arvo 1,6–1,9) positiivisuuden määrittämiseksi voidaan kuitenkin tarkastella myös annosvasteen voimakkuutta, tilastollista merkitsevyyttä sekä liuottimen/kantaja-aineen ja positiivisen kontrollikemikaalin vasteiden yhdenmukaisuutta (3) (6) (32).
32. Jos positiivisen rajavasteen SI on 1,6–1,9, käyttäjät voivat tulosten positiivisuuden vahvistamiseksi tarkastella SI-arvojen lisäksi myös muita tietoja, kuten annosvasteen voimakkuutta, merkkejä koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta tai erittäin voimakkaasta ärsytyksestä ja tarvittaessa tilastollista merkittävyyttä (10). Lisäksi on syytä ottaa huomioon testiaineen erilaiset ominaisuudet, mukaan luettuina mahdolliset rakenteelliset yhtäläisyydet tunnettuihin ihoherkistävistä aiheuttaviin aineisiin, sen hiirelle mahdollisesti aiheuttama erittäin voimakas ihoärsytys ja havaitun annosvasteen luonne. Näitä ja muita näkökohtia käsitellään yksityiskohtaisesti lähteessä (4).

33. Kun tiedot kerätään erikseen kustakin hiirestä, voidaan niiden perusteella analysoida tilastollisesti mahdollista annosvasteen voimakkuutta ja sen tasoa. Tilastoarvioinnissa voidaan myös arvioida annosvasteen voimakkuutta ja tehdä asianmukaisesti mukautettuja vertailuja testiryhmillä (esimerkiksi pareittain annoksen saaneen ryhmän vertailu samanaikaisesti tehtyyn liuotin-/kantaja-ainekontrolliryhmään). Tilastollisina analyyseina voidaan käyttää esimerkiksi lineaarista regressiota tai Williamin testiä, joilla arvioidaan annos-vastekehitystä, sekä Dunnettin testiä, jolla pareja vertaillaan toisiinsa. Tutkijan on otettava asianmukaisen tilastoanalyysimenetelmän valinnassa huomioon varianssien mahdolliset erot ja muut vastaavat ongelmat, jotka saattavat edellyttää määrittystulosten muuntamista tai non-parametrinen tilastoanalyysiä. Tutkijan on kuitenkin mahdollisesti tehtävä SI-laskelmia ja tilastoanalyysieja sekä käyttäen tiettyjä määrittyspisteitä koskevia tietoja (niin sanotut käyrän ulkopuolella olevat vasteet) että ilman niitä.

MITTAUSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

Mittautulokset

34. Tulokset on esitettävä taulukkona, josta käyvät ilmi eläinkohtaiset BrdU-merkki-indeksin arvot, ryhmän eläinkohtaisten BrdU-merkki-indeksien keskiarvo, siihen liittyvä virhetermi (esimerkiksi keskihajonta tai keskiarvon keski-
virhe) sekä kunkin annosryhmän keskimääräinen SI samanaikaiseen liuotin-/kantaja-ainekontrolliryhmään verrattuna.

Loppuraportti

35. Loppuraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testi- ja kontrollikemikaalit

- tunnistetiedot (esimerkiksi CAS- ja EC-numerot, jos tiedossa; alkuperä, puhtaus, tunnetut epäpuhtaudet, eränumero),
- fysikaalinen olomuoto ja fysikaaliskemialliset ominaisuudet (esimerkiksi haihtuvuus, stabiilisuus, liukoisuus),
- jos kyseessä on seos, sen koostumus ja ainesosien suhteelliset osuudet.

Liuotin/kantaja-aine

- tunnistetiedot (puhtaus, tarvittaessa konsentraatio, käytetty tilavuus),
- perustelut kantaja-aineen valinnalle.

Koe-eläimet

- CBA-hiirten alkuperä,
- eläinten mikrobiologinen tila, jos se on tiedossa,
- eläinten määrä ja ikä,
- eläinten alkuperä, koe-eläintilat, ruokavalio ja niin edelleen.

Testiolosuhteet

- ELISA-välineistön alkuperä, erän numero ja valmistajan laadunvarmistus-/laadunvalvontatiedot (vasta-aineen herkkyys ja spesifisyys sekä osoitusraja),
- tiedot testiaineen valmistelusta ja annostelusta,
- perustelut annostasojen valinnalle (mukaan luettuina ennen testiä mahdollisesti suoritettujen kartoitusten tulokset),
- käytetyt kantaja- ja testiaineiden konsentraatiot ja annostellun testiaineen kokonaismäärä,
- tiedot ravinnon ja veden laadusta (mukaan luettuina ruokavalion tyyppi/alkuperä, veden alkuperä),
- tiedot käsittely- ja näytteenottoaikatauluista,
- toksisuuden mittausten menetelmät,

- tutkimusten positiivisuuden tai negatiivisuuden arviointiperusteet,
- tiedot menettelystä poikkeamisesta ja selvitys siitä, miten poikkeaminen vaikuttaa tutkimussuunnitelmaan ja tuloksiin.

Luotettavuuden tarkistus

- yhteenveto viimeisimmän luotettavuustarkistuksen tuloksista, mukaan luettuina tiedot käytetystä testiaineesta, konsentraatiosta ja kantaja-aineesta,
- testauslaboratorion samaan aikaan ja/tai aiemmin tehtyjen positiivisten ja samanaikaisten negatiivisten (liuotin/kantaja-aine) kontrollien tulokset,
- jos testissä ei ollut samanaikaista positiivista kontrollia, viimeisimmän positiivisen kontrollin päivämäärä ja laboratorioraportti sekä yksityiskohtainen selvitys laboratorion aiemmista positiivista kontrollia koskevista tiedoista, joiden perusteella samanaikaista positiivista kontrollia ei tarvitsisi käyttää.

Tulokset

- kunkin hiiren paino annostelun alussa ja aikataulun mukaisen humanin lopettamisen yhteydessä sekä kunkin annosryhmän keskimääräinen virhetermi ja asiaan liittyviin muuttujiin liittyvä virhetermi (esimerkiksi keskihajonta tai keskiarvon keskivirhe),
- toksisuuden ilmeneminen ajan funktiona ja toksisuuden merkit, mukaan luettuna mahdollinen annostelualueen ihoärsytys, erikseen kullekin eläinyksilölle,
- taulukko yksittäisten hiirten BrdU-merkki-indekseistä ja kunkin käsittelyryhmän SI-arvoista,
- kunkin käsittelyryhmän hiirikohtaisten BrdU-merkki-indeksien keskimääräinen virhetermi ja siihen liittyviin muuttujiin liittyvä virhetermi (esimerkiksi keskihajonta ja keskiarvon keskivirhe) sekä käyrän ulkopuolella olevien vasteiden analyysin tulokset kullekin käsittelyryhmälle,
- laskettu SI ja asianmukaisesti määritetty vaihteluväli, jossa otetaan huomioon eläintenvälinen vaihtelu, testiaineella ja kontrolliaineella käsitellyissä ryhmissä,
- annosvasteen voimakkuus,
- tarvittaessa tilastoanalyysit.

Tulosten pohdinta

- tulosten lyhyt kommentointi, annos-vasteanalyysi ja tarvittaessa tilastoanalyysi sekä johtopäätös siitä, onko testiainetta pidettävä ihoherkistystä aiheuttavana.

LÄHDELUETTELO

- (1) OECD (2010). Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- (2) Chamberlain, M. ja Basketter, D. A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol.* 34, s. 999–1002.
- (3) Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Kimber, I. ja Loveless, S. E. (1996). The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.* 34, s. 985–997.
- (4) Basketter, D. A., Gerberick, G. F. ja Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.* 36, s. 327–33.
- (5) Van Och, F. M. M., Slob, W., De Jong, W. H., Vandebriel, R. J. ja Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.* 146, s. 49–59.

- (6) ICCVAM (1999). The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH-julkaisunumero 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf
- (7) Dean, J. H., Twerdok, L. E., Tice, R. R., Sailstad, D. M., Hattan, D. G., Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 34(3), s. 258–273.
- (8) Haneke, K. E., Tice, R. R., Carson, B. L., Margolin, B. H., Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 34(3), s. 274–286.
- (9) Sailstad, D. M., Hattan, D., Hill, R. N., Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 34(3), s. 249–257.
- (10) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH-julkaisunumero 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm>
- (11) ICCVAM (2009). Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf
- (12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. ja Hoshuyama, S. (2005). Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.* 25, s. 129–134.
- (13) OECD (1992). Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- (14) Kreiling, R., Hollnagel, H. M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M. S., Griem, P., Dreesen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. ja Wendel, A. (2008). Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.* 46, s. 1896–1904.
- (15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J. C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. ja Mehling, A. (2009). Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 55, s. 90–96.
- (16) ILAR (1996). Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7. painos. Washington, DC: National Academies Press.
- (17) ICCVAM (2009). Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH-julkaisunumero 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStd.pdf
- (18) McGarry, H. F. (2007). The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.* 238, s. 71–89.
- (19) Kimber, I., Dearman, R. J., Scholes E. W. ja Basketter, D. A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.* 93, s. 13–31.
- (20) OECD (2002). Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- (21) Reeder, M. K., Broomhead, Y. L., DiDonato, L. ja DeGeorge, G. L. (2007). Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist* 96, s. 235.
- (22) ICCVAM (2009). Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fdLLNA/BRDcomplete.pdf>

- (23) Hayes, B. B., Gerber, P. C., Griffey, S. S. ja Meade, B. J. (1998). Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug Chem. Toxicol.* 21, s. 195–206.
- (24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H. C., Ruzicka, T., Ahr, H. J., Lehmann, P. ja Vohr, V. W. (1998). An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 153, s. 83–94.
- (25) Woolhiser, M. R., Hayes, B. B. ja Meade, B. J. (1998). A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.* 8, s. 245–256.
- (26) Hayes, B. B. ja Meade, B. J. (1999). Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol.* 22, s. 491–506.
- (27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A. O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. ja Vohr, H. W. (2005). A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.* 212, s. 60–68.
- (28) Vohr, H. W. ja Ahr, H. J. (2005). The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.* 79, s. 721–728.
- (29) Patterson, R. M., Noga, E. ja Germolec D. (2007). Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect.* 115, s. 1023–1028.
- (30) ICCVAM (2009). Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acuteTox/Tox_workshop.htm.
- (31) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- (32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Basketter, D. A., Lea, L., House, R. V., Ladies, G. S., Loveless, S. E. ja Hastings, K. L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health* 53, s. 563–79.
- (33) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksytyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osa-tekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssia) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (33).

Vertailuaine: Herkistävä tai muu kuin herkistävä aine, jota käytetään testiaineen vertailustandardina. Vertailuaineella on oltava seuraavat ominaisuudet: i) luotettava alkuperä, joka pysyy samana, ii) samanlainen rakenne ja toiminta kuin testiaineryhmällä, iii) tunnetut fysikaaliskemialliset ominaisuudet, iv) todisteet tunnetuista vaikutuksista ja v) tunnettu voimakkuus tavoitellulla vasteen vaihteluvälillä.

Väärä negatiivinen: Testiaine on testimenetelmässä määritetty väärin perustein negatiiviseksi tai inaktiiviseksi, vaikka se itse asiassa on positiivinen tai aktiivinen (33).

Väärä positiivinen: Testiaine on testimenetelmässä määritetty väärin perustein positiiviseksi tai aktiiviseksi, vaikka se itse asiassa on negatiivinen tai inaktiivinen (33).

Vaarallisuus: Mahdollisuus kielteiseen terveys- tai ympäristövaikutukseen. Kielteinen vaikutus edellyttää altistumista vähintään tietyllä tasolla.

Laboratoriodenvälinen uusittavuus: Se, missä määrin eri (pätevät) laboratoriot voivat saada aikaan laadullisesti ja määrällisesti samanlaisia tuloksia käyttämällä samoja tutkimussuunnitelmia ja testaamalla samaa testiainetta. Laboratoriodenvälinen uusittavuus määritetään esivalidointi- ja validointimenettelyissä, ja sillä osoitetaan, missä määrin testi voidaan onnistuneesti toteuttaa eri laboratorioissa (33).

Laboratorionsisäinen uusittavuus: Se, missä määrin tietyn laboratorion pätevä henkilöstö voi saada onnistuneesti aikaan samat tulokset käyttämällä tiettyä tutkimussuunnitelmaa eri ajankohtina (33).

Käyrän ulkopuolella oleva vaste: Käyrän ulkopuolella olevalla vasteella tarkoitetaan havaintoa, joka poikkeaa merkittävästi muista populaation sattumanvaraisten näytteiden arvoista.

Laadunvarmistus: Hallintomenettely, jossa testausta suorittavista henkilöistä riippumattomat henkilöt arvioivat laboratorion testausstandardien, vaatimusten ja kirjanpitoimenettelyjen noudattamista ja tiedonsiirron tarkkuutta.

Luotettavuus: Laajuus, jolla testimenetelmä on toistettavissa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa pidemmällä aikavälillä käytettäessä samaa menettelyä. Se arvioidaan laskemalla uusittavuus samassa laboratoriossa ja eri laboratorioissa (33).

Ihoherkistys: Immunologinen prosessi, joka aiheutuu herkän yksilön paikallisesta altistamisesta tietylle kemialliselle allergeenille, joka aiheuttaa iholla immuunivasteen, joka voi johtaa kosketusherkistykseen.

Stimulaatioindeksi (SI): Testiaineen ihoärsytyspotentiaalin arvioimiseksi laskettu arvo, jolla esitetään käsiteltyjen ryhmien soluproliferaation ja samanaikaisen kantaja-aineella käsitellyn kontrolliryhmän soluproliferaation välinen suhde.

Testiaine (testikemikaali): Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.”
