

II

(Nelegislatívne akty)

NARIADENIA

NARIADENIE KOMISIE (EÚ) č. 640/2012

zo 6. júla 2012,

ktorým sa na účely prispôsobenia technickému pokroku mení a dopĺňa nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 440/2008, ktorým sa ustanovujú testovacie metódy podľa nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemických látok (REACH)

(Text s významom pre EHP)

EURÓPSKA KOMISIA,

so zreteľom na Zmluvu o fungovaní Európskej únie,

z 22. septembra 2010 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely⁽³⁾ a so smernicou Rady 86/609/EHS z 24. novembra 1986 o aproximácii zákonov, iných právnych predpisov a správnych opatrení členských štátov týkajúcich sa ochrany zvierat používaných na pokusné a iné vedecké účely⁽⁴⁾. Tento návrh bol prekonzultovaný so zainteresovanými stranami.

so zreteľom na nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 z 18. decembra 2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemikálií (REACH) a o zriadení Európskej chemickej agentúry, o zmene a doplnení smernice 1999/45/ES a o zrušení nariadenia Rady (EHS) č. 793/93 a nariadenia Komisie (ES) č. 1488/94, smernice Rady 76/769/EHS a smerníc Komisie 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES⁽¹⁾, a najmä na jeho článok 13 ods. 3,

(3) Nariadenie (ES) č. 440/2008 by sa preto malo zodpovedajúcim spôsobom zmeniť a doplniť.

(4) Opatrenia stanovené v tomto nariadení sú v súlade so stanoviskom výboru zriadeného podľa článku 133 nariadenia (ES) č. 1907/2006,

keďže:

PRIJALA TOTO NARIADENIE:

(1) Nariadenie Komisie (ES) č. 440/2008⁽²⁾ obsahuje testovacie metódy na účely stanovenia fyzikálno-chemických vlastností, toxicity a ekotoxicity látok, ktoré sa majú uplatňovať na účely nariadenia (ES) č. 1907/2006.

Článok 1

Príloha k nariadeniu (ES) č. 440/2008 sa mení a dopĺňa v súlade s prílohou k tomuto nariadeniu.

(2) Je potrebné aktualizovať nariadenie (ES) č. 440/2008 tak, aby prioritne zahŕňalo nové a aktualizované alternatívne testovacie metódy, ktoré prijala OECD s cieľom obmedziť počet zvierat používaných na pokusné účely v súlade so smernicou Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ

Článok 2

Toto nariadenie nadobúda účinnosť tretím dňom po jeho uverejnení v Úradnom vestníku Európskej únie.

⁽¹⁾ Ú. v. EÚ L 396, 30.12.2006, s. 1.

⁽²⁾ Ú. v. EÚ L 142, 31.5.2008, s. 1.

⁽³⁾ Ú. v. EÚ L 276, 20.10.2010, s. 33.

⁽⁴⁾ Ú. v. ES L 358, 18.12.1986, s. 1.

Toto nariadenie je záväzné v celom rozsahu a priamo uplatniteľné vo všetkých členských štátoch.

V Bruseli 6. júla 2012

Za Komisiu
predseda
José MANUEL BARROSO

PRÍLOHA

Príloha k nariadeniu (ES) č. 440/2008 sa mení a dopĺňa takto:

1. Kapitola B.42 sa nahrádza takto:

„B. 42. SENZIBILIZÁCIA KOŽE: LOKÁLNA SKÚŠKA LYMFATICKÝCH UZLÍN

ÚVOD

1. Usmernenia Organizácie pre hospodársku spoluprácu a rozvoj (OECD) na testovanie chemikálií a testovacie metódy EÚ vychádzajúce z týchto usmernení sa pravidelne revidujú vzhľadom na vedecký pokrok, zmeny regulačných potrieb a dobré životné podmienky zvierat. Pôvodná testovacia metóda (TM) na určenie senzibilizácie kože u myši, tzv. lokálna skúška lymfatických uzlín (LLNA; usmernenie OECD na vykonávanie testov 429; kapitola B.42 tejto prílohy) už bola prijatá (1). Podrobnosti validácie LLNA a revízia prác v tejto oblasti boli uverejnené v (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Aktualizovaná LLNA je založená na hodnotení skúseností a vedeckých údajov (12). Táto testovacia metóda je druhou testovacou metódou vytvorenou na posúdenie potenciálu chemikálií (látok a zmesí) spôsobiť senzibilizáciu kože u zvierat. Prvá testovacia metóda (t. j. usmernenie OECD na vykonávanie testov 406; kapitola B.6 tejto prílohy) využíva testy s morčatami, a to maximalizačný test morčiat a Buehlerov test (13). LLNA poskytuje výhody v porovnaní s metódou B.6 a usmernením OECD na vykonávanie testov 406 (13), pokiaľ ide o dobré životné podmienky zvierat. Táto aktualizovaná testovacia metóda LLNA zahŕňa súbor noriem výkonnosti (PS) (dodatok 1), ktoré možno použiť na hodnotenie stavu validácie nových a/alebo upravených testovacích metód, ktoré sú z funkčného a mechanického hľadiska podobné LLNA v súlade so zásadami usmerňujúceho dokumentu OECD č. 34 (14).
2. LLNA skúma indukčnú fázu senzibilizácie kože a poskytuje kvantitatívne údaje vhodné na hodnotenie odozvy na dávku. Treba poznamenať, že ľahké/mierne senzibilizátory, ktoré sa odporúčajú ako vhodné chemikálie na pozitívnu kontrolu v testovacích metódach na morčatách (t. j. kapitola B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov č. 406) (13), sú tiež vhodné na použitie pri LLNA (6) (8) (15). Redukovaná lokálna skúška lymfatických uzlín (rLLNA), pri ktorej by sa mohlo využívať až o 40 % menej zvierat, je v tejto testovacej metóde tiež opísaná ako jedna z možností (16) (17) (18). Metódu rLLNA možno použiť v prípade, ak vznikla regulačná potreba potvrdiť negatívny predpoklad potenciálu senzibilizácie kože, za predpokladu, že existuje súlad so všetkými ostatnými špecifikáciami protokolov LLNA, ako je to opísané v tejto testovacej metóde. Predpoklad negatívneho výsledku by sa mal urobiť na základe všetkých dostupných informácií, ako je opísané v odseku 4. Pred použitím metódy rLLNA je potrebné poskytnúť jasné a vedecké odôvodnenia použitia tejto metódy. Ak sa pri rLLNA napriek očakávaniam dosiahne pozitívny alebo nejasný výsledok, možno bude potrebné vykonať ďalšie testovanie, aby bola možná interpretácia alebo objasnenie zistenia. Skúška rLLNA by sa nemala využívať na identifikáciu nebezpečnosti testovaných látok, ktoré spôsobujú senzibilizáciu kože v prípade, keď sú potrebné informácie o odozve na dávku, ako napríklad ďalšia kategorizácia pre nariadenie (ES) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí a globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemických látok Organizácie Spojených národov (OSN).

VYMEDZENIE POJMOV

3. Použité definície sú uvedené v dodatku 2.

ÚVODNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

4. LLNA poskytuje alternatívnu metódu na identifikáciu možných chemikálií spôsobujúcich senzibilizáciu kože. Neznamená to nevyhnutne, že vo všetkých prípadoch sa má použiť LLNA namiesto testu s morčatami (t. j. metóda B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13), ale skôr to, že táto skúška je rovnako hodnotná a môže sa použiť ako alternatíva, v ktorej pozitívne a negatívne výsledky vo všeobecnosti nevyžadujú ďalšie potvrdenie. Testovacie laboratórium by malo posúdiť všetky dostupné informácie o testovanej látke pred uskutočnením štúdie. Takéto informácie budú obsahovať identitu a chemickú štruktúru testovanej látky, jej fyzikálno-chemické vlastnosti, výsledky všetkých ostatných *in vitro* alebo *in vivo* testov toxicity s testovanou látkou a toxikologické údaje o štruktúrne príbuzných chemikáliách. Tieto informácie treba vziať do úvahy pri stanovovaní, či LLNA je pre danú látku vhodná (vzhľadom na nezlučiteľnosť obmedzených druhov chemikálií s LLNA – pozri odsek 5), a ako pomoc pri výbere dávok.
5. LLNA je metóda *in vivo*, a to znamená, že pri posúdení aktivity alergickej kontaktnej senzibilizácie sa nevylučuje používanie zvierat. Môže však umožniť zníženie počtu zvierat potrebných na tento účel. Okrem toho LLNA ponúka značné zjemnenie spôsobu, akým sa zvieratá používajú na testy alergickej kontaktnej senzibilizácie (znižuje bolesť a utrpenie zvierat). LLNA sa zakladá na posudzovaní imunologických reakcií vyvolaných chemikáliami počas indukčnej fázy senzibilizácie. Na rozdiel od testov s morčatami (t. j. metóda B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13) LLNA nevyžaduje, aby sa vyvolali reakcie dermálnej hypersenzitivity. Okrem toho LLNA nevyžaduje použitie adjuvansu ako v prípade maximalizačného testu morčiat (13). Tým LLNA znižuje bolesť a utrpenie zvierat. Napriek výhodám, ktoré LLNA má v porovnaní s metódou B.6 a usmernením OECD na vykonávanie testov 406, je potrebné uznať, že existujú určité obmedzenia, v prípade ktorých by sa mohlo vyžadovať použitie metódy B.6 alebo usmernenia OECD na vykonávanie testov 406 (13) [napr. falošné negatívne zistenia v LLNA s určitými kovmi, falošné pozitívne zistenia s určitými kožnými dráždivými látkami (ako napríklad niektoré druhy povrchovo aktívnych chemikálií) (19) (20) alebo rozpustnosť testovanej látky]. Okrem

toho chemické skupiny alebo látky, ktoré obsahujú potenciálne zmätočné funkčné skupiny (21), si tiež môžu vyžadovať použitie testov s morčatami (t. j. B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406 (13)). Ďalej na základe obmedzenej validačnej databázy, ktorá sa skladá predovšetkým z prípravkov na ochranu rastlín, pri LLNA je pravdepodobnejšie, že pri týchto druhoch testovacích látok sa dosiahne pozitívny výsledok ako pri teste s morčatami (22). Pri testovaní prípravkov by sa však malo vziať do úvahy zahrnutie podobných látok so známymi výsledkami ako referenčných látok na preukázanie toho, že LLNA riadne funguje (pozri odsek 16). Okrem takto identifikovaných obmedzení by sa LLNA mala uplatňovať pri testovaní všetkých látok okrem prípadov, keď tieto látky majú vlastnosti, ktoré by mohli narušať presnosť LLNA.

PRINCÍP TESTU

6. Základným princípom, na ktorom sa LLNA zakladá, je, že senzibilizátory vyvolávajú primárnu proliferáciu lymfocytov v lymfatickej uzline v drénovanom mieste aplikácie testovanej látky. Táto proliferácia je úmerná dávke a účinnosti aplikovaného alergénu a poskytuje jednoduchý prostriedok na získanie kvantitatívneho merania senzibilizácie. Proliferácia sa meria porovnávaním priemeru proliferácie v každej pokusnej skupine s priemerom proliferácie v kontrolnej skupine, ktorej sa podáva nosič (VC). Stanoví sa pomer priemernej proliferácie v každej ošetrenej skupine a priemernej proliferácie v súbežnej kontrolnej skupine s nosičom, ktorý sa označuje ako stimulačný index (SI), a musí mať hodnotu aspoň tri pred ďalším prípadným vyhodnotením testovanej látky ako potenciálneho senzibilizátora kože. Uvedené metódy sa zakladajú na používaní rádioaktívneho značenia *in vivo* na meranie proliferácie zvýšeného počtu buniek v drénovaných ušných lymfatických uzlinách. Môžu sa však použiť iné koncové body na posúdenie počtu proliferujúcich buniek za predpokladu, že budú úplne splnené požiadavky na normy výkonnosti (dodatok 1).

OPIS SKÚŠKY

Výber druhov zvierat

7. Vybraným druhom pre tento test je myš. Použijú sa mladé dospelé negravidné samice myši, ktoré nikdy nevrhli mláďatá, kmeňa CBA/Ca alebo CBA/J. Na začiatku štúdie by zvieratá mali byť vo veku 8 – 12 týždňov a rozdiel medzi hmotnosťami zvierat má byť minimálny a nemá byť vyšší ako 20 % priemernej hmotnosti. Alternatívne sa môžu použiť iné kmene a samce, ak sa na základe získaných údajov dá uspokojivo dokázať, že neexistujú významné odlišnosti špecifické pre kmeň a/alebo pohlavie v odozve na LLNA.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

8. Myši by sa mali umiestniť v skupinách (23), pokiaľ sa neposkytne primerané vedecké odôvodnenie ich umiestnenia jednotlivo. Teplota miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 ± 3 °C. Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 % a pokiaľ možno by nemala prevyšovať 70 %, okrem obdobia počas čistenia miestnosti, cieľom je, aby relatívna vlhkosť dosahovala 50 % – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody.

Príprava zvierat

9. Zvieratá sa vyberú náhodne a sú označené tak, aby sa umožnila jednotlivá identifikácia (ale nie formou ušných značiek), a držia sa v kliebkach aspoň 5 dní pred začiatkom podávania dávok, aby sa aklimatizovali na laboratórne podmienky. Pred začatím ošetrovania sa všetky zvieratá vyšetrí, aby sa zaistilo, že nemajú žiadne viditeľné kožné poranenia.

Príprava dávok

10. Chemikálie v tuhom skupenstve by sa pred podaním dávky do ucha myši mali rozpustiť alebo suspendovať v rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je to vhodné, rozriediť. Kvapalné chemikálie možno podávať priamo alebo pred podaním rozriediť. V prípade nerozpustných chemikálií, ako napríklad tých, ktoré sa vo všeobecnosti používajú ako zdravotnícke pomôcky, by sa pred podaním dávky do ucha myši mala uskutočniť zvýšená extrakcia vo vhodnom rozpúšťadle, aby sa odhalili všetky extrahovateľné zložky, ktoré sa budú testovať. Testované látky sa pripravujú každý deň okrem prípadu, keď údaje o stabilite preukazujú prijateľnosť uskladnenia.

Kontrola spoľahlivosti

11. Riadne vykonanie skúšky sa dokazuje pomocou pozitívnych kontrolných chemikálií, ktoré reagujú primeranou a reprodukovateľnou citlivosťou ako senzibilizujúce testované látky, pre ktoré je dobre charakterizovaná šírka odozvy. Odporúča sa zahrnúť súbežnú pozitívnu kontrolu, pretože to dokazuje kompetenciu laboratória úspešne vykonať každú skúšku a umožňuje posúdenie vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a porovnateľnosti. Pozitívnu kontrolu v každej štúdií vyžadujú aj niektoré regulačné orgány, a preto by používatelia mali pred vykonaním skúšky LLNA konzultovať s príslušnými orgánmi. Rutinné použitie súbežnej pozitívnej kontroly sa podporuje aj preto, aby sa predišlo potrebe ďalšieho testovania na zvieratách s cieľom splniť také požiadavky, ktoré by mohli vyplývať z použitia periodickej pozitívnej kontroly (pozri odsek 12). Pozitívna kontrola by mala spôsobiť pozitívnu odozvu na LLNA pri úrovni expozície, pri ktorej sa očakáva nárast stimulačného indexu (SI) > 3 v porovnaní s negatívnou kontrolnou skupinou. Dávka pozitívnej kontroly by sa mala

- zvoliť tak, aby nespôsobila nadmerné podráždenie kože alebo systémovú toxicitu a aby indukcia bola reprodukovateľná, ale nie nadmerná (t. j. $SI > 20$ by bola nadmerná indukcia). Vhodnými pozitívnymi kontrolami sú 25 % 3-fenyl-2-hexylpropenál [číslo CAS (Chemical Abstracts Service) 101-86-0] v acetóne, olivový olej (v pomere 4: 1, objemové percentá) a 5 % benzotiazol-2-tiol (číslo CAS 149-30-4) v *N,N*-dimetylformamide (pozri dodatok 1 tabuľku 1). Môžu sa vyskytnúť okolnosti, keď sa v riadne zdôvodnených prípadoch môžu použiť iné pozitívne kontroly, ktoré spĺňajú uvedené kritériá.
12. Hoci sa odporúča súbežná pozitívna kontrolná skupina, môžu sa vyskytnúť situácie, keď môže byť vhodné periodické testovanie (t. j. v intervaloch najviac 6 mesiacov) pozitívnych kontrol v prípade tých laboratórií, ktoré vykonávajú LLNA pravidelne (t. j. LLNA vykonávajú v priebehu jedného mesiaca aspoň raz) a ktoré majú zavedenú historickú databázu pozitívnych kontrol, ktorá preukazuje schopnosť laboratória dosahovať reprodukovateľné a presné výsledky s pozitívnymi kontrolami. Primeranú odbornosť s použitím LLNA možno úspešne preukázať dosiahnutím konzistentných pozitívnych výsledkov s pozitívnou kontrolou najmenej v 10 nezávislých testoch uskutočnených v určitom primeranom období (t. j. v období kratšom ako jeden rok).
13. Súbežná pozitívna kontrolná skupina by sa mala zahrnúť vždy, keď dôjde k procedurálnej zmene v súvislosti s LLNA (napr. k zmene vyškoleného personálu, zmene materiálov a/alebo reagentov používaných pri testovacej metóde, zmene nástrojov používaných pri testovacej metóde, zmene zdroja testovaných zvierat), a takéto zmeny je potrebné zaznamenať v laboratórnych správach. Je potrebné zvážiť vplyv týchto zmien na primeranosť predtým zriadenej historickej databázy pri určovaní potreby zriadenia novej historickej databázy na zaznamenávanie konzistentnosti výsledkov pozitívnej kontroly.
14. Výskumní pracovníci by si mali uvedomiť, že rozhodnutie vykonať štúdiu pozitívnych kontrol na periodickom základe namiesto súbežných pozitívnych kontrol môže mať následky na primeranosť a prijateľnosť negatívnych výsledkov štúdie získaných bez súbežnej pozitívnej kontroly počas intervalu medzi každou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly. Ak sa dosiahne napríklad falošný negatívny výsledok v periodickej štúdiu pozitívnej kontroly, negatívne výsledky získané s testovanou látkou v intervale medzi poslednou prijateľnou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly a neprijateľnou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly možno spochybniť. Dôsledky týchto výsledkov treba dôkladne zvážiť pri určovaní toho, či vykonať súbežné pozitívne kontroly alebo iba periodické pozitívne kontroly. Treba tiež zvážiť použitie menšieho počtu zvierat v súbežnej pozitívnej kontrolnej skupine, ak je to vedecky odôvodnené a ak laboratórium na základe konkrétnych laboratórnych historických údajov preukáže, že možno použiť menší počet myší (12).
15. Aj keď by sa pozitívna kontrola mala testovať v nosiči, o ktorom je známe, že vyvoláva konzistentnú odozvu (napr. acetón: olivový olej v pomere 4: 1, objemové percentá), môžu sa vyskytnúť určité regulačné situácie, v ktorých bude potrebné vykonať aj testovanie v neštandardnom nosiči (klinicky/chemicky zodpovedajúcim roztoku) (24). Ak sa súbežná pozitívna kontrola testuje v odlišnom nosiči ako testovaná látka, potom treba do testu súbežnej pozitívnej kontroly zahrnúť samostatnú kontrolnú skupinu, ktorej sa podáva nosič.
16. V prípadoch hodnotenia testovaných látok, ktoré patria do konkrétnej chemickej triedy, alebo rozsahu odoziev môžu byť užitočné aj referenčné látky, aby sa preukázalo, že testovacia metóda na zisťovanie potenciálu týchto druhov testovaných látok spôsobiť senzibilizáciu kože funguje riadne. Vhodné referenčné látky majú mať tieto vlastnosti:

- štrukturálnu a funkčnú podobnosť s triedou testovanej látky, ktorá je predmetom testovania,
- známe fyzikálne/chemické vlastnosti,
- podporné údaje z LLNA,
- podporné údaje z ďalších zvieracích a/alebo ľudských modelov.

TESTOVACÍ POSTUP

Počet zvierat a veľkosť dávky

17. Na dávkovú skupinu sa používajú aspoň štyri zvieratá, aspoň tri koncentrácie testovanej látky a k tomu súbežná negatívna kontrolná skupina, ktorej sa podáva iba nosič pre testovanú látku, a pozitívna kontrola (súbežná alebo nedávna, podľa laboratórnych pravidiel s prihliadnutím na odseky 11 – 14). Treba zvážiť testovanie viacerých dávok pozitívnej kontroly, najmä ak sa testuje na prerušovanej báze. So zvieratami v kontrolných skupinách by sa malo zaobchádzať rovnakým spôsobom ako s pokusnými zvieratami okrem prípadov, keď sa ošetrovanie testovanou látkou nevykonáva.

18. Výber dávky a nosiča by mal byť založený na odporúčaníach uvedených v odkazoch (3) a (5). Následné dávky sa zvyčajne vyberajú z vhodných sérií koncentrácií, napr. 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % atď. Výber zo sérií koncentrácií je potrebné primerane vedecky zdôvodniť. Všetky existujúce informácie o toxicite (napr. akútnej toxicite a podráždení kože), ako aj štrukturálne a fyzikálno-chemické informácie o predmetnej testovanej látke (a/alebo štrukturálne príbuzných látkach) by sa mali prípadne posúdiť výberom troch po sebe idúcich koncentrácií tak, aby najvyššia koncentrácia maximalizovala expozíciu, pričom by sa však zabránilo systémovej toxicite a/alebo nadmernému lokálnemu podráždeniu kože (3) (25). Ak tieto informácie nie sú k dispozícii, možno bude potrebné vykonať počiatočný predbežný skríningový test (pozri odseky 21 – 24).
19. Nosič by nemal ovplyvňovať výsledok testu a mal by sa vybrať na základe maximalizácie rozpustnosti s cieľom získať najvyššiu dosiahnuteľnú koncentráciu, pričom vznikne roztok/suspénzia vhodná na aplikáciu testovanej látky. Odporúčané nosiče sú: acetón: olivový olej (4: 1, objemové percentá), N,N-dimetylformamid, metyletylketón, propylénglykol a dimetylsulfoxid (19), ale môžu sa použiť aj iné nosiče, ak sa uvedie uspokojivé vedecké zdôvodnenie. V určitých situáciách môže byť potrebné použiť ako ďalšiu kontrolu klinicky vhodný roztok alebo komerčný prípravok, v ktorom sa testovaná látka predáva. Osobitnú pozornosť je potrebné venovať zabezpečeniu toho, aby sa hydrofilné testované látky zabudovali do systému nosiča, ktorý zvlhčuje pokožku, a rýchlo neunikli, a to začlenením vhodných rozpúšťadiel (napr. 1 % Pluronic® L92). Preto je potrebné vyhýbať sa použitiu čisto vodných nosičov.
20. Spracovanie lymfatických uzlín jednotlivých myší umožňuje posúdiť variabilitu medzi zvieratami a štatisticky porovnať rozdiel medzi meraniami testovanej látky a kontrolnej skupiny, ktorej sa podáva nosič (pozri odsek 35). Okrem toho sa po poskytnutí informácií o jednotlivých zvieratách môže prehodnotiť možnosť zníženia počtu myší v pozitívnej kontrolnej skupine (12). Navyše niektoré regulačné orgány požadujú zber údajov o jednotlivých zvieratách. Niektoré regulačné orgány však môžu považovať za prijateľné aj spojené údaje o zvieratách a v takejto situácii majú používatelia možnosť zbierať buď údaje o jednotlivých zvieratách, alebo spojené údaje o zvieratách.

Predbežný skríningový test

21. V prípade, že nie sú k dispozícii informácie na stanovenie najvyššej dávky testovanej látky (pozri odsek 18), treba vykonať predbežný skríningový test s cieľom stanoviť primeranú úroveň testovanej dávky na použitie v LLNA. Cieľom predbežného skríningového testu je poskytnúť usmernenie na výber maximálnej úrovne dávky na použitie v hlavnej štúdii LLNA v prípade, že nie sú dostupné informácie o koncentrácii, ktorá spôsobuje systémovú toxicitu (pozri odsek 23) a/alebo nadmerné lokálne podráždenie kože (pozri odsek 24). Maximálna úroveň testovanej dávky by mala obsahovať 100 % testovanej látky v prípade kvapalín alebo maximálnu možnú koncentráciu v prípade tuhých látok alebo suspenzií.
22. Predbežný skríningový test sa vykonáva za podmienok, ktoré sú identické s hlavnou štúdiou LLNA, s tým rozdielom, že sa neposudzuje proliferácia lymfatickej uzliny a môže sa použiť menší počet zvierat na dávkovú skupinu. Navrhne sa jedno alebo dve zvieratá na dávkovú skupinu. U všetkých myší sa každý deň pozorujú klinické príznaky systémovej toxicity alebo lokálneho podráždenia v mieste aplikácie. Telesná hmotnosť zvierat sa zaznamenáva na začiatku testu a pred usmrtením (deň 6). Obidve uši každej myši sa vyšetrí, či nemajú príznaky erytému (sčervenania kože), a vyhodnotia sa podľa tabuľky 1 (25). Hrúbka ucha sa meria pomocou meradla hrúbky (napr. digitálnym mikrometrom alebo meradlom hrúbky Peacock Dial) v deň 1 (pred aplikáciou dávky), v deň 3 (približne 48 hodín po prvej dávke) a v deň 6. Okrem toho možno hrúbku ucha v deň 6 určiť na základe meraní vážením vzoriek uší, ktoré by sa malo vykonať po humánnom usmrtení zvierat. Nadmerné lokálne podráždenie kože indikuje hodnota erytému ≥ 3 a/alebo zvýšenie hrúbky ucha o ≥ 25 % v ktorýkoľvek deň merania (26) (27). Najvyššia dávka vybraná pre hlavnú štúdiu LLNA bude najbližšia nižšia dávka z predbežných skríningových sérií koncentrácií (pozri odsek 18), ktorá nespôsobuje systémovú toxicitu a/ani nadmerné lokálne podráždenie kože.

Tabuľka 1

Hodnotenia erytému

Pozorovanie	Hodnotenie
Žiadny erytém	0
Veľmi slabý erytém (sotva pozorovateľný)	1
Jasne ohraničený erytém	2
Mierny až silný erytém	3
Výrazný erytém (tmavočervený) až vytvorenie chrasty zabraňujúcej posúdeniu erytému	4

23. Okrem 25 % zvýšenia hrúbky ucha (26) (27) sa štatisticky významné zvýšenie hrúbky ucha v testovanej skupine myší v porovnaní s kontrolnou skupinou myší použilo aj na identifikáciu dráždivých látok v LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Štatisticky významné zvýšenie hrúbky ucha môže nastať aj vtedy, keď dôjde k menšiemu zvýšeniu ako 25 %, nespája sa však konkrétne s nadmerným podráždením kože (30) (32) (33) (34).
24. Nasledujúce klinické pozorovania môžu indikovať systémovú toxicitu (35) (36), ak sú súčasťou integrovaného posudzovania, to znamená, že môžu indikovať maximálnu úroveň dávky na použitie v hlavnej štúdii LLNA: zmeny funkcie nervového systému (napr. piloerекcia, ataxia, triaška a kŕče); zmeny správania (napr. agresia, zmena pri čistení, výrazná zmena stupňa aktivity); zmena dýchania (t. j. zmena frekvencie alebo intenzity dýchania, ako napríklad zadúšanie, dýchavičnosť a šelest) a zmeny spotreby potravy a vody. Okrem toho treba v hodnotení zvážiť príznaky letargie a/alebo apatie a akékoľvek klinické príznaky silnejšej alebo dlhodobejšej bolesti a utrpenia alebo viac ako 5 % zníženie telesnej hmotnosti medzi dňom 1 a 6 a úmrtnosť. Umierajúce zvieratá alebo zvieratá, ktoré majú očividne silné bolesti alebo vykazujú pretrvávajúce príznaky silného utrpenia, by sa mali humánnym spôsobom usmrtiť (37).

Harmonogram pokusov v hlavnej štúdii

25. Harmonogram pokusov v rámci skúšky je takýto:

- Deň 1: Označte každé zviera a zaznamenajte jeho hmotnosť a akékoľvek klinické pozorovania. Začnite s aplikáciou 25 µl z príslušného zriedenia testovanej látky, samotného nosiča alebo pozitívnej kontroly (súbežnej alebo súčasnej, podľa laboratórnych pravidiel s prihliadnutím na odseky 11 – 15) na zadnú stranu každého ucha.
- Dni 2 a 3: Zopakujte aplikačný postup uskutočnený v deň 1.
- Dni 4 a 5: Žiadne ošetrovanie.
- Deň 6: Zaznamenajte hmotnosť každého zvieraťa. Injekčne podajte všetkým pokusným a kontrolným myšiam 250 µl sterilného fosfátom tlmeneho fyziologického roztoku (PBS) obsahujúceho 20 µCi ($7,4 \times 10^5$ Bq) ^3H -metyltymidínu cez chvostovú žilu. Alternatívne injekčne podajte všetkým myšiam 250 µl sterilného PBS obsahujúceho 2 µCi ($7,4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I -jódodeoxyuridínu a 10^{-5}M -fluorodeoxyuridínu cez chvostovú žilu. O päť hodín sa zvieratá humane usmrtia. Drénované ušné lymfatické uzliny sa odstránia z každého ucha myši a spracujú sa spoločne v PBS pre každé zviera (metóda jednotlivých zvierat) alebo sa lymfatické uzliny odstránia z každého ucha a spoločne spracujú v PBS pre každú pokusnú skupinu (metóda spojených pokusných skupín). Údaje a diagramy identifikácie a disekcie lymfatických uzlín možno nájsť v odkaze (12). Pri ďalšom monitorovaní lokálnej odozvy kože v hlavnej štúdii možno do protokolu štúdie zahrnúť ďalšie parametre, ako napríklad hodnotenie erytému ucha alebo merania hrúbky ucha (získané pomocou meradla hrúbky alebo vážením vzoriek uší pri pitve).

Príprava bunkových suspenzií

26. Jednobunková suspenzia buniek lymfatických uzlín (LNC), odobraná bilaterálne s použitím metódy jednotlivých zvierat alebo alternatívnej metódy spojenej pokusnej skupiny, sa pripravuje jemným mechanickým pretlačením cez sitko z nerezovej ocele so šírkou oka 200 µm alebo inou prijateľnou technikou na prípravu jednobunkovej suspenzie. Bunky lymfatických uzlín sa dvakrát premyjú v prebytku PBS a DNA sa vyzráža 5 % kyselinou trichlóroctovou (TCA) pri 4 °C počas 18 hod. (3). Pelety sa buď opätovne suspendujú v 1 ml TCA a prenesú do scintilačných fľaštičiek obsahujúcich 10 ml scintilačnej kvapaliny na čítanie ^3H , alebo sa prenesú priamo do gammačítacích túb na čítanie ^{125}I .

Stanovenie proliferácie buniek (naviazaná rádioaktivita)

27. Začlenenie ^3H -metyltymidínu sa meria β -scintilačným čítaním ako dezintegrácia za minútu (DPM). Začlenenie ^{125}I -jódodeoxyuridínu sa meria čítaním ^{125}I a tiež sa vyjadruje ako dezintegrácia za minútu (DPM). V závislosti od použitej metódy sa začlenenie vyjadri ako DPM/myš (metóda jednotlivých zvierat) alebo DPM/pokusná skupina (metóda spojenej pokusnej skupiny).

Redukovaná LLNA

28. V určitých situáciách, keď vznikne regulačná potreba potvrdiť negatívny predpoklad potenciálu senzibilizácie kože, možno použiť voliteľný protokol rLLNA (16) (17) (18) s použitím menšieho počtu zvierat, ak existuje súlad so všetkými ostatnými špecifikáciami protokolov LLNA v tejto testovacej metóde. Pred použitím metódy rLLNA je potrebné poskytnúť jasné a vedecké odôvodnenia použitia tejto metódy. Ak sa dosiahne pozitívny alebo nejasný výsledok, možno bude potrebné vykonať ďalšie testovanie, aby bola možná interpretácia alebo objasnenie zistenia.

29. Zníženie počtu dávkových skupín je jediný rozdiel medzi protokolmi testovacích metód LLNA a rLLNA a z tohto dôvodu rLLNA neposkytuje informácie o odozve na dávku. Preto by sa rLLNA nemala používať v prípadoch, keď sú potrebné informácie o odozve na dávku. Podobne ako pri viacdávkovej LLNA by koncentrácia testovanej látky hodnotenej v rLLNA mala byť maximálnou koncentráciou, ktorá nespôsobuje zjavnú systémovú toxicitu a/ani nadmerné lokálne podráždenie kože myši (pozri odsek 18).

POZOROVANIA

Klinické pozorovania

30. Každá myš sa starostlivo vyšetrí aspoň jedenkrát denne na všetky klinické príznaky, či už ide o lokálne podráždenie v mieste aplikácie, alebo systémovú toxicitu. Všetky pozorovania sa systematicky zaznamenávajú, pričom každá myš má individuálny záznam. Plány na monitorovanie by mali zahŕňať kritériá na rýchlu identifikáciu tých myší, ktoré vykazujú systémovú toxicitu, nadmerné lokálne podráždenie alebo poleptanie kože a ktoré majú byť humánne usmrtené (37).

Telesné hmotnosti

31. Ako sa uvádza v odseku 25, telesné hmotnosti jednotlivých zvierat by sa mali odmerať na začiatku testu a pri naplánovanom usmrtení zvierat.

VÝPOČET VÝSLEDKOV

32. Výsledky sa vyjadrujú ako stimulačný index (SI). Pri použití metódy jednotlivých zvierat sa SI získa vydelením priemernej hodnoty DPM/myš v rámci každej skupiny, ktorej sa podávala testovaná látka, a pozitívnej kontrolnej skupiny priemernou hodnotou DPM/myš kontrolnej skupiny, ktorej sa podávalo rozpúšťadlo/nosič. Priemerná hodnota SI kontrolných skupín, ktorým sa podával nosič, je potom 1. Pri použití metódy spojenej pokusnej skupiny sa SI získa vydelením hodnoty spojeného rádioaktívneho začlenenia v každej pokusnej skupine hodnotou začlenenia v spojenej kontrolnej skupine s nosičom; a tým sa získa priemerná hodnota SI.
33. V rozhodovacom procese sa za pozitívny výsledok považuje stimulačný index ≥ 3 . Pri určovaní toho, či je hraničný výsledok pozitívny, sa však môže použiť aj sila odozvy na dávku, štatistický význam a konzistentnosť odoziev na rozpúšťadlo/nosič a odoziev na pozitívnu kontrolu (4), (5), (6).
34. Ak je potrebné vysvetliť získané výsledky, pozornosť by sa mala venovať rôznym vlastnostiam testovanej látky vrátane toho, či má štrukturálny vzťah k látkam, ktoré sú známymi senzibilizátormi kože, či spôsobuje nadmerné lokálne podráždenie kože, a charakteru pozorovanej odozvy na dávku. Tieto a ostatné hľadiská sa podrobne rozoberajú inde (7).
35. Zbieranie údajov o rádioaktivite na úrovni jednotlivých myší umožní vykonať štatistickú analýzu prítomnosti a úrovne vzťahu medzi dávkou a odozvou. Každé štatistické posúdenie by mohlo zahŕňať hodnotenie vzťahu medzi dávkou a odozvou, ako aj vhodne upravené porovnávanie pokusných skupín (napr. porovnávanie v pároch skupiny, ktorej sa podáva dávka, a súbežnej kontrolnej skupiny s nosičom). Štatistické analýzy môžu zahŕňať napr. lineárnu regresiu alebo Williamsov test na posúdenie trendov vo vzťahu medzi dávkou a odozvou a Dunnettov test na porovnávanie v pároch. Pri výbere vhodnej metódy štatistickej analýzy by si výskumný pracovník mal uvedomovať možné nerovnosti rozdielov a ďalšie súvisiace problémy, ktoré si môžu vyžadovať premenu údajov alebo štatistickú analýzu založenú na iných ako parametrických údajoch. Výskumný pracovník bude možno v každom prípade musieť vykonať výpočty SI a štatistické analýzy s určitými dátovými bodmi a bez nich (niekedy sa tieto údaje nazývajú „extrémne hodnoty“).

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

36. Údaje by sa mali uvádzať v tabuľkovej podobe. Pri použití metódy jednotlivých zvierat sa v tabuľke uvedú hodnoty DPM u jednotlivých zvierat, skupinová priemerná hodnota DPM/zviera, súvisiaci rozsah chyby (napr. SD, SEM) a priemerná hodnota SI každej dávkovej skupiny v porovnaní so súbežnou kontrolnou skupinou s nosičom. Pri použití metódy spojenej pokusnej skupiny sa v tabuľke uvedie priemerná/prostredná hodnota DPM a priemerná hodnota SI každej dávkovej skupiny v porovnaní so súbežnou kontrolnou skupinou s nosičom.

Správa o teste

37. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testované a kontrolné látky:

- identifikačné údaje (napr. čísla CAS, čísla EC, ak sú k dispozícii, zdroj, čistota; známe nečistoty, číslo šarže),
- fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti (napr. prchavosť, stabilita, rozpustnosť),

- v prípade zmesi zloženie a relatívny percentuálny podiel zložiek.

Rozpúšťadlo/nosič:

- identifikačné údaje (čistota, v prípade potreby koncentrácia, použitý objem),
- zdôvodnenie voľby nosiča.

Testovacie zvieratá:

- použitý kmeň myší CBA,
- mikrobiologický stav zvierat, ak je známy,
- počet a vek zvierat,
- zdroj zvierat, podmienky umiestnenia, krmivo atď.

Podmienky testu:

- informácie o príprave a aplikácii testovanej látky,
- zdôvodnenie výberu dávky (vrátane výsledkov z predbežného skríningového testu, ak sa uskutočnil),
- použité koncentrácie nosiča a testovanej látky a celkové množstvo aplikovanej testovanej látky,
- údaje o kvalite krmiva a vody (vrátane druhu/zdroja krmiva, zdroja vody),
- podrobný opis harmonogramu podávania dávok a odberu vzoriek,
- metódy merania toxicity,
- kritériá na hodnotenie štúdií ako pozitívnych alebo negatívnych,
- informácie o akýchkoľvek odchýlkach od protokolu a vysvetlenie, ako odchýlky ovplyvňujú návrh a výsledky štúdie.

Kontrola spoľahlivosti:

- súhrn výsledkov poslednej kontroly spoľahlivosti vrátane informácií o testovanej látke, koncentrácii a použitom nosiči,
- údaje o súbežnej a/alebo historickej pozitívnej kontrole a súbežnej negatívnej kontrole testovacieho laboratória,
- ak nebola zahrnutá súbežná pozitívna kontrola, dátum a laboratórna správa o najaktuálnejšej periodickej pozitívnej kontrole a správa s historickými údajmi o pozitívnej kontrole, ktorými laboratórium zdôvodňuje nevykonanie súbežnej pozitívnej kontroly.

Výsledky:

- hmotnosti jednotlivých myší na začiatku podávania dávky a pri naplánovanom usmrtení, ako aj priemerný a súvisiaci rozsah chyby (napr. SD a SEM) pre každú pokusnú skupinu,
- časový priebeh nástupu príznakov toxicity u každého zvieraťa vrátane podráždenia kože na mieste podania látky, ak sa vyskytnú,
- tabuľka hodnôt DPM a SI u jednotlivých myší (metóda jednotlivých zvierat) alebo priemerných/prostredných hodnôt DPM a SI (metóda spojenej pokusnej skupiny) v každej pokusnej skupine,

- priemerný a súvisiaci rozsah chyby (napr. SD, SEM) v súvislosti s hodnotou DPM/myš v každej pokusnej skupine a výsledky analýzy extrémnej hodnoty v každej pokusnej skupine pri použití metódy jednotlivých zvierat,
- výpočet SI a vhodná miera variability, ktorá berie do úvahy variabilitu medzi zvieratami v skupinách, ktorým sa podáva testovaná látka, a v kontrolných skupinách pri použití metódy jednotlivých zvierat,
- vzťah medzi dávkou a odozvou,
- v prípade potreby štatistické analýzy.

Rozbor výsledkov:

- stručný komentár v súvislosti s výsledkami, analýza odozvy na dávku, štatistické analýzy, ak existujú, s uvedením záveru, či by sa testovaná látka mala považovať za látku spôsobujúcu senzibilizáciu kože.

LITERATÚRA

1. OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. K dispozícii na stránke: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
2. Kimber, I. and Basketter, D. A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol.*, 30, 165 – 169.
3. Kimber, I., Dearman, R. J., Scholes, E. W. and Basketter, D. A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol.*, 93, 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. and 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. Healt.*, 53, 563 – 579.
5. Chamberlain, M. and Basketter, D. A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999 – 1002.
6. Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Kimber, I. and Loveless, S. E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985 – 997.
7. Basketter, D. A., Gerberick, G. F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327 – 333.
8. Van Och, F. M. M., Slob, W., De Jong, W. H., Vandebriel, R. J. and 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, 49 – 59.
9. 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, 258 – 273.
10. 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, 274 – 286.
11. 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, 249 – 257.
12. ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozícii na stránke: [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, Paris. K dispozícii na stránke: [<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, Paris. K dispozícii na stránke: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
15. Dearman, R. J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D. A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol.*, 18, 281 – 284.
16. Kimber, I., Dearman, R. J., Betts, C. J., Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Kern, P. S., Patlewicz, G. Y. and Basketter, D. A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181 – 185.
17. ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. K dispozícii na stránke: [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 Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozícii na stránke: [<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 Publication No 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozícii na stránke: [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. and 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, 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. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 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 Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozícii na stránke: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/>].
23. ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
24. McGarry, H. F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, *Toxicol.*, 238, 71 – 89.
25. OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 404, Paris, France. K dispozícii na stránke: 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. and DeGeorge, G. L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, *Toxicologist*, 96, 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. K dispozícii na stránke: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fdLLNA/BRDcomplete.pdf>].

28. Hayes, B. B., Gerber, P. C., Griffey, S. S. and Meade, B. J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195 – 206.
29. Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H. C., Ruzicka, T., Ahr, H. J., Lehmann, P. and Vohr, V. W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83 – 94.
30. Woolhiser, M. R., Hayes, B. B. and Meade, B. J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth.*, 8, 245 – 256.
31. Hayes, B. B. and 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, 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. and Vohr, H. W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60 – 68.
33. Vohr, H. W. and Ahr, H. J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721 – 728.
34. Patterson, R. M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfisteria extract, *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023 – 1028.
35. OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. K dispozícii na stránke: [<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. K dispozícii na stránke: [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, Paris. K dispozícii na stránke: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].

Dodatok 1

Normy výkonnosti na posudzovanie navrhovaných podobných alebo upravených testovacích metód LLNA na senzibilizáciu kože

ÚVOD

1. Cieľom noriem výkonnosti (PS) je oznámiť základ, na ktorom možno určiť, že nové testovacie metódy, či už chránené (t. j. chránené autorským právom, obchodnou značkou, registrované), alebo nechránené, sú dostatočne presné a spoľahlivé na konkrétne účely testovania. Tieto normy výkonnosti sú založené na validovaných a akceptovaných testovacích metódach a možno ich použiť na hodnotenie spoľahlivosti a presnosti ďalších podobných metód (hovorovo nazývaných testy „me-too“), ktoré sú založené na podobných vedeckých zásadách a merajú alebo prognózujú rovnaký biologický alebo toxický účinok (14).
2. Pred prijatím upravených metód (t. j. navrhnutých potenciálnych zlepšení schválenej testovacej metódy) je potrebné vykonať hodnotenie s cieľom určiť účinok navrhnutých zmien na výkonnosť testu a rozsah, v akom takéto zmeny ovplyvňujú informácie dostupné pre ďalšie zložky procesu validácie. V závislosti od počtu a povahy navrhovaných zmien, získaných údajov a sprievodnej dokumentácie k týmto zmenám by sa na ne mal vzťahovať buď rovnaký proces validácie, akým prechádza nový test, alebo prípadne obmedzené posúdenie spoľahlivosti a relevantnosti na základe zavedených noriem výkonnosti (14).
3. Podobné alebo upravené metódy navrhnuté na použitie v tejto testovacej metóde by sa mali posúdiť s cieľom určiť ich spoľahlivosť a presnosť pri použití chemikálií, ktoré zastupujú celý rozsah hodnotení LLNA. S cieľom zabrániť neoprávnenému použitiu zvierat sa dôrazne odporúča, aby tvorcovia modelov konzultovali s príslušnými orgánmi pred začatím validačných štúdií v súlade s normami výkonnosti a usmernením uvedeným v tejto testovacej metóde.
4. Tieto normy výkonnosti sú založené na zosúladených normách výkonnosti amerického medzigov. agentúrneho koordin. výboru pre validáciu alternatívnych metód (US-ICCVAM), Európskeho centra pre validáciu alternatívnych metód (ES-ECVAM) a japonského centra pre validáciu alternatívnych metód (JaCVAM) (12), na základe ktorých sa hodnotí platnosť podobných alebo upravených verzií LLNA. Do noriem výkonnosti patria nevyhnutné zložky testovacej metódy, odporúčané referenčné chemikálie a normy presnosti a spoľahlivosti, ktoré by navrhnutá metóda mala dosiahnuť alebo presiahnuť.

I. Nevyhnutné zložky testovacej metódy

5. S cieľom zabezpečiť, že podobná alebo upravená metóda LLNA bude z funkčného a mechanického hľadiska podobná metóde LLNA a bude merať rovnaký biologický účinok, do protokolu testovacej metódy by sa mali zahrnúť tieto zložky:

- Testovacia látka by sa mala lokálne aplikovať na obe uši myši.
- Proliférácia lymfocytov by sa mala merať v lymfatickej uzline v drénovanom mieste aplikácie testovanej látky.
- Proliférácia lymfocytov by sa mala merať počas indukčnej fázy senzibilizácie kože.
- Zvolená najvyššia dávka testovanej látky by mala obsahovať maximálnu koncentráciu látky, ktorá nespôsobuje systémovú toxicitu a/ani nadmerné lokálne podráždenie kože myši. Najvyššia dávka pozitívnych referenčných chemikálií by mala byť prinajmenšom taká vysoká ako hodnoty LLNA EC3 zodpovedajúcich referenčných chemikálií (pozri tabuľku 1), ktoré nespôsobujú systémovú toxicitu a/ani nadmerné lokálne podráždenie kože myši.
- Každá štúdia by mala obsahovať súbežnú kontrolnú skupinu, ktorej sa podáva nosič, a v prípade potreby by sa mala použiť aj súbežná pozitívna kontrola.
- V skupine, ktorej sa podáva dávka, by mali byť minimálne štyri zvieratá.
- Možno zbierať údaje o jednotlivých zvieratách alebo spojené údaje o zvieratách.

Ak nebude splnené niektoré z týchto kritérií, potom tieto normy výkonnosti nemožno použiť na validáciu podobnej alebo upravenej metódy.

II. Minimálny zoznam referenčných látok

6. Zosúladené normy výkonnosti US-ICCVAM, ES-ECVAM a japonského JaCVAM (12) identifikovali 18 minimálnych referenčných chemikálií, ktoré by sa mali použiť, a štyri nepovinné referenčné chemikálie [t. j. látky, s ktorými sa v LLNA dosiahli falošné pozitívne alebo falošné negatívne výsledky v porovnaní s výsledkami, ktoré sa dosiahli u ľudí a morčiat (B.6 alebo usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13), a preto poskytujú príležitosť na dosiahnutie rovnakej alebo lepšej výkonnosti ako LLNA], ktoré sú zahrnuté do noriem výkonnosti LLN. Kritériá výberu na identifikáciu týchto chemikálií boli:

- zoznam referenčných chemikálií zastupujúcich druhy látok, ktoré sa zvyčajne testujú v súvislosti s ich potenciálom spôsobiť senzibilizáciu kože, a rozsah odoziev, ktoré LLNA dokáže merať alebo prognózovať,
- látky mali dobre vymedzené chemické štruktúry,
- pre každú látku boli dostupné údaje z LLNA testov na morčiatách (t. j. B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13) a (ak existujú) údaje z testov na ľuďoch a
- látky boli ľahko dostupné z komerčného zdroja.

Odporúčané referenčné chemikálie sú uvedené v tabuľke 1. Štúdie, v ktorých sa používajú navrhnuté referenčné chemikálie, by sa mali hodnotiť v nosiči, s ktorým sú uvedené v tabuľke 1. V situáciách, keď uvedená látka nie je dostupná, môžu sa použiť iné látky, ktoré spĺňajú uvedené kritériá výberu, a tento výber sa musí dostatočne zdôvodniť.

Tabuľka 1

Odporúčané referenčné chemikálie pre normy výkonnosti LLNA

Číslo	Chemikálie ⁽¹⁾	Číslo CAS	Forma	Nosič ⁽²⁾	EC3 % ⁽³⁾	P ⁽⁴⁾	0,5x – 2,0x EC3	Skutočný rozsah EC3	LLNA/morča	LLNA/človek
1.	5-chlór-2-metyl-4-izotiazolín-3-ón (CMI)/2-metyl-4-izotiazolín-3-ón (MI) ⁽⁵⁾	26172-55-4/2682-20-4	kvap.	DMF	0,009	1	0,0045 – 0,018	NC	+/+	+/+
2.	DNCB	97-00-7	tuhá	AOO	0,049	15	0,025 – 0,099	0,02 – 0,094	+/+	+/+
3.	4-fenyléndiamín	106-50-3	tuhá	AOO	0,11	6	0,055 – 0,22	0,07 – 0,16	+/+	+/+
4.	chlorid kobaltnatý	7646-79-9	tuhá	DMSO	0,6	2	0,3 – 1,2	0,4 – 0,8	+/+	+/+
5.	izoeugenol	97-54-1	kvap.	AOO	1,5	47	0,77 – 3,1	0,5 – 3,3	+/+	+/+
6.	2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	tuhá	DMF	1,7	1	0,85 – 3,4	NC	+/+	+/+
7.	citral	5392-40-5	kvap.	AOO	9,2	6	4,6 – 18,3	5,1 – 13	+/+	+/+
8.	HCA	101-86-0	kvap.	AOO	9,7	21	4,8 – 19,5	4,4 – 14,7	+/+	+/+
9.	eugenol	97-53-0	kvap.	AOO	10,1	11	5,05 – 20,2	4,9 – 15	+/+	+/+
10.	fenyl-benzoát	93-99-2	tuhá	AOO	13,6	3	6,8 – 27,2	1,2 – 20	+/+	+/+
11.	škoricový alkohol	104-54-1	tuhá	AOO	21	1	10,5 – 42	NC	+/+	+/+
12.	imidazolidinyl močovina	39236-46-9	tuhá	DMF	24	1	12 – 48	NC	+/+	+/+
13.	metyl-metakrylát	80-62-6	kvap.	AOO	90	1	45 – 100	NC	+/+	+/+
14.	chlórbenzén	108-90-7	kvap.	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/- (*)
15.	izopropanol	67-63-0	kvap.	AOO	50	1	NA	NA	-/-	-/+
16.	kyselina mliečna	50-21-5	kvap.	DMSO	25	1	NA	NA	-/-	-/- (*)
17.	metyl salicylát	119-36-8	kvap.	AOO	20	9	NA	NA	-/-	-/-
18.	kyselina salicylová	69-72-7	tuhá	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/-

Číslo	Chemikálie ⁽¹⁾	Číslo CAS	Forma	Nosič ⁽²⁾	EC3 % ⁽³⁾	P ⁽⁴⁾	0,5x – 2,0x EC3	Skutočný rozsah EC3	LLNA/morča	LLNA/človek
Nepovinné látky na preukázanie lepšej výkonnosti vo vzťahu k LLNA										
19.	laurylsulfát sodný	151-21-3	tuhá	DMF	8,1	5	4,05 – 16,2	1,5 – 17,1	+/-	+/-
20.	etylénglykol dimetakrylát	97-90-5	kvap.	MEK	28	1	14 – 56	NC	+/-	+/+
21.	xylén	1330-20-7	kvap.	AOO	95,8	1	47,9 – 100	NC	+/ ^(**)	+/-
22.	chlorid nikelnatý	7718-54-9	tuhá	DMSO	5	2	NA	NA	-/+	-/+

Skratky: AOO = acetón; olivový olej (4: 1, objemové percentá); číslo CAS = Chemical Abstracts Service Number; DMF = N,N-dimetylformamid; DMSO = dimetylsulfoxid; DNCB = 2,4-dinitrochlórbenzén; EC3 = odhadovaná koncentrácia, ktorá je potrebná na dosiahnutie stimulačného indexu 3; morča = výsledok testu s morčatom (t. j. B.6 alebo usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13); HCA = 3-fenyl-2-hexylpropanál; kvap. = kvapalná forma; LLNA = výsledok lokálnej skúšky lymfatických uzlín myši (t. j. B.42 alebo usmernenie OECD na vykonávanie testov 429) (1); MEK = metyletyl ketón; NA = neuplatňuje sa, pretože stimulačný index je nižší ako 3; NC = nie je vypočítaný, pretože údaje boli získané z jedinej štúdie; tuhá = tuhá forma látky; nosič = testovaný nosič.

(*) Považuje sa za látku, ktorá nespôsobuje senzibilizáciu kože u ľudí vzhľadom na skutočnosť, že v klinických náplastových testoch neboli zistené žiadne výsledky, látka nie je súčasťou náplastových testov ako jeden z alergénov a neboli zistené žiadne prípady senzibilizácie u ľudí.

(**) Údaje z testov s morčatami nie sú dostupné.

⁽¹⁾ Chemikálie by sa mali pripravovať každý deň okrem prípadu, keď údaje o stabilite preukazujú prijateľnosť uskladnenia.

⁽²⁾ Vzhľadom na pravdepodobný vplyv rôznych nosičov na výkonnosť LLNA by sa mal pre každú referenčnú chemikáliu použiť odporúčaný nosič (24) (32).

⁽³⁾ Priemerná hodnota sa používa v prípade, že je k dispozícii viac ako jedna hodnota EC3. Pri negatívnych látkach (t. j. so stimulačným indexom < 3) sa vyjadruje najvyššia testovaná koncentrácia.

⁽⁴⁾ Počet štúdií LLNA, z ktorých boli získané údaje.

⁽⁵⁾ Komerčne dostupné ako Kathon CG (číslo CAS 55965-84-9), čo je zmes CMI a MI v pomere 3: 1. Relatívne koncentrácie každej zložky sa pohybujú v rozmedzí od 1,1 % do 1,25 % (CMI) a od 0,3 % do 0,45 % (MI). Neaktívne zložky sú magnéziové soli (21,5 % až 24 %) a dusičnan meďnatý (0,15 % až 0,17 %), pričom zvyšok tvorí 74 % až 77 % vody. Kathon CG je k dispozícii prostredníctvom spoločnosti Sigma-Aldrich a Rohm and Haas (teraz sa spoločnosť nazýva Dow Chemical Corporation).

III. Vymedzené normy spoľahlivosti a presnosti

7. Presnosť podobnej alebo upravenej metódy LLNA by mala splniť alebo presiahnuť výkonnostnú normu LLNA, ak sa posudzuje s použitím minimálne 18 referenčných chemikálií, ktoré sa majú použiť. Nová alebo upravená metóda by mala viesť k správnej klasifikácii založenej na rozhodovaní typu „áno/nie“. Nová alebo upravená metóda však nemusí správne klasifikovať všetky minimálne referenčné chemikálie, ktoré sa majú použiť. Ak bol napríklad jeden zo slabých senzibilizátorov nesprávne klasifikovaný, na preukázanie rovnakej výkonnosti by sa mohla zväziť možnosť zdôvodniť túto nesprávnu klasifikáciu a poskytnúť ďalšie primerané údaje (napr. výsledky testov, ktoré správne klasifikujú ostatné látky s podobnými fyzikálnymi, chemickými a senzibilizačnými vlastnosťami, aké majú tie látky, ktoré boli nesprávne klasifikované). Za týchto okolností by sa stav validácie novej alebo upravenej testovacej metódy LLNA posudzoval od prípadu k prípadu.

Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť

8. Na určenie vnútrolaboratórnej reprodukovateľnosti by sa nová alebo upravená metóda LLNA mala posudzovať s použitím senzibilizujúcej látky, ktorá je v LLNA dobre charakterizovaná. Preto sú normy výkonnosti LLNA založené na variabilite výsledkov z opakovaných testov s 3-fenyl-2-hexylpropanálom (HCA). Na posúdenie vnútro-laboratórnej spoľahlivosti by sa prahové hodnoty odhadovanej koncentrácie (ECt) HCA mali určiť pri štyroch osobitných príležitostiach, pričom medzi jednotlivými testami je časový rozdiel aspoň jeden týždeň. Prijateľnú vnútrolaboratórnu reprodukovateľnosť indikuje schopnosť laboratória získať v každom teste s HCA hodnoty ECt medzi 5 % a 20 %, čo predstavuje rozsah 0,5 – 2,0-násobku priemernej hodnoty EC3 definovanej pre HCA (10 %) v LLNA (pozri tabuľku 1).

Medzilaboratórna reprodukovateľnosť

9. Medzilaboratórna reprodukovateľnosť novej alebo upravenej metódy LLNA by sa mala posudzovať s použitím dvoch senzibilizujúcich látok, ktoré sú v LLNA dobre charakterizované. Normy výkonnosti LLNA sú založené na variabilite výsledkov testov s HCA a 2,4-dinitrochlórbenzénom (DNCB) v rôznych laboratóriách. Hodnoty ECt by sa mali určiť nezávisle z jednej štúdie vykonanej minimálne v troch rôznych laboratóriách. Na preukázanie prijateľnej medzilaboratórnej reprodukovateľnosti by každé laboratórium malo získať hodnoty ECt medzi 5 % a 20 % pri HCA a 0,025 % až 0,1 % pri DNCB, čo predstavuje rozsah 0,5 – 2,0-násobku priemerných koncentrácií EC3 definovaných pre HCA (10 %) a DNCB (0,05 %) v LLNA (pozri tabuľku 1).

Dodatok 2

Vymedzenie pojmov

Presnosť: Miera zhody výsledkov testovacej metódy s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o opatrenie výkonnosti testovacej metódy a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa ako synonymum s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (14).

Referenčná látka: Látka spôsobujúca alebo nespôsobujúca senzibilizáciu, ktorá sa používa ako štandardná látka na porovnanie s testovanou látkou. Referenčná látka by mala mať tieto vlastnosti: i) konzistentný(-é) a spoľahlivý(-é) zdroj(-e); ii) štruktúrnu a funkčnú podobnosť s triedou látok, ktoré sa budú testovať; iii) známe fyzikálno-chemické vlastnosti; iv) podporné údaje o známych účinkoch a v) známu potenciu v rozsahu želanej odozvy.

Prahová hodnota odhadovanej koncentrácie (ECt): Odhadovaná koncentrácia testovanej látky potrebná na dosiahnutie stimulačného indexu, ktorý naznačuje pozitívnu odozvu.

Odhadovaná koncentrácia tri (EC3): Odhadovaná koncentrácia testovanej látky potrebná na dosiahnutie stimulačného indexu 3.

Falošný negatívny výsledok: Testovaná látka je testovanou metódou nesprávne identifikovaná ako negatívna alebo neaktívna, pričom v skutočnosti je pozitívna alebo aktívna.

Falošný pozitívny výsledok: Testovaná látka je testom nesprávne identifikovaná ako pozitívna alebo aktívna, pričom v skutočnosti je negatívna alebo neaktívna.

Nebezpečnosť: Potenciál škodlivého účinku na zdravie alebo životné prostredie. Škodlivý účinok sa prejavuje až pri dostatočnej hladine expozície.

Medzilaboratórna reprodukovateľnosť: Miera, do akej rôzne kvalifikované laboratóriá, ktoré používajú rovnaký protokol a testujú rovnaké testovacie látky, dokážu dosiahnuť kvalitatívne a kvantitatívne podobné výsledky. Medzilaboratórna reprodukovateľnosť sa určuje počas postupov pred validáciou a v rámci postupov validácie a znamená mieru, do akej možno test úspešne prenášať medzi laboratóriami. Takisto je známa ako reprodukovateľnosť medzi laboratóriami (14).

Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť: Určenie miery, do akej kvalifikovaní pracovníci v rámci jedného laboratória dokážu úspešne opakovať výsledky s použitím konkrétneho protokolu v rôznom čase. Takisto je známa ako reprodukovateľnosť v rámci laboratória (14).

Test me-too: Hovorový názov testovacej metódy, ktorá je štrukturálne a funkčne podobná validovanej a akceptovanej referenčnej testovacej metóde. Takáto testovacia metóda by bola kandidátom na ďalšiu validáciu. Môže sa používať namiesto podobnej testovacej metódy (14).

Extrémna hodnota: Extrémna hodnota je pozorovanie, ktoré je značne odlišné od ostatných hodnôt v náhodnej vzorke z populácie.

Normy výkonnosti (PS): Normy založené na validovanej testovacej metóde, ktoré slúžia ako základ na hodnotenie porovnateľnosti navrhovanej testovacej metódy, ktorá je funkčne a mechanicky podobná. Patria sem: i) nevyhnutné zložky testovacej metódy; ii) minimálny zoznam referenčných chemikálií vybraných spomedzi látok používaných na preukázanie prijateľnej výkonnosti validovanej testovacej metódy a iii) porovnateľné úrovne presnosti a spoľahlivosti založené na tom, čo sa získalo pre validovanú testovaciu metódu a čo by navrhovaná testovacia metóda mala preukázať pri hodnotení pomocou minimálneho zoznamu referenčných chemikálií (14).

Chránená testovacia metóda: Testovacia metóda, ktorej výrobu a distribúciu obmedzujú patenty, autorské práva, obchodné značky atď.

Zabezpečovanie kvality: Riadiaci proces, v ktorom jednotlivci nezávislí od osôb vykonávajúcich testy posudzujú súlad s laboratórnymi testovacími normami, požiadavkami a postupmi vedenia záznamov, ako aj presnosť prenosu údajov.

Referenčné chemikálie: Chemikálie vybrané na použitie v procese validácie, pre ktoré už sú známe odozvy v referenčnom testovacom systéme *in vitro* alebo *in vivo* alebo odozvy u daných druhov zvierat. Tieto chemikálie by mali byť zástupcami tried chemikálií, v súvislosti s ktorými sa očakáva použitie testovacej metódy, a mali by zastupovať celý rozsah odoziev od silných po slabé alebo negatívne odozvy, ktoré možno očakávať od chemikálií, pri ktorých sa môže metóda použiť. Rôzne skupiny referenčných chemikálií sa môžu vyžadovať v rôznych štádiách procesu validácie a pre rôzne testovacie metódy a použitia testov (14).

Relevantnosť: Opis vzťahu testu k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej test správne meria alebo prognózuje biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testovacej metódy (14).

Spoľahlivosť: Meria rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda počas istého časového obdobia opakovane vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti (14).

Senzibilizácia kože: Imunologický proces, ku ktorému dochádza po lokálnom vystavení náchylného jednotlivca chemickému alergénu, ktorý vyvoláva kožnú imunitnú odozvu, ktorá môže viesť k vytvoreniu kontaktnej senzibilizácie.

Stimulačný index (SI): Hodnota vypočítaná na posúdenie potenciálu testovanej látky spôsobiť senzibilizáciu kože; ide teda o pomer proliferácie v pokusných skupinách a proliferácie v súbežných kontrolných skupinách, ktorým sa podáva nosič.

Testovaná látka (tiež sa nazýva testovaná chemikália): Akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Validovaná testovacia metóda: Testovacia metóda, v súvislosti s ktorou sa ukončili validačné štúdie na stanovenie relevantnosti (vrátane presnosti) a spoľahlivosti na konkrétny účel. Je dôležité poznamenať, že validovaná testovacia metóda nemusí mať dostatočnú výkonnosť, pokiaľ ide o presnosť a spoľahlivosť, aby bola prijateľná pre navrhovaný účel (14).“

2. Kapitola B.46 sa nahrádza takto:

„B.46. PODRÁŽDENIE KOŽE IN VITRO: TEST NA MODELI REKONŠTRUOVANEJ ĽUDSKEJ POKOŽKY

ÚVOD

1. Podráždením kože sa rozumie reverzibilné poškodenie kože po aplikácii testovanej chemikálie maximálne na štyri hodiny [v znení definície podľa globálneho harmonizovaného systému klasifikácie a označovania chemických látok (GHS) Organizácie Spojených národov (OSN) a nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí (1) (3)]. Touto testovacou metódou (TM) sa zabezpečuje postup *in vitro*, ktorý možno použiť na identifikáciu nebezpečnosti dráždivých chemikálií (látok a zmesí) v súlade s kategóriou 2 GHS OSN a CLP EÚ (1) (2) (3). V EÚ a v ďalších regiónoch, ktoré neprijali povinnú kategóriu 3 GHS OSN (látky spôsobujúce mierne podráždenie), túto testovaciu metódu možno použiť aj na identifikáciu chemikálií, ktoré nie sú klasifikované, t. j. sú ‚bez kategórie‘ v zmysle GHS OSN a CLP EÚ (1) (3). Táto testovacia metóda sa môže použiť na určenie podráždenia pokožky chemikáliami ako nezávislý test, ktorý slúži ako náhrada za testy podráždenia kože *in vivo* v rámci stratégie testovania na viacerých úrovniach (4 a kapitola B.4 tejto prílohy).

2. Posudzovanie podráždenia kože sa zvyčajne vykonáva na laboratórnych zvieratách [usmernenie OECD na vykonávanie testov 404; kapitola B.4 tejto prílohy] (4). Pokiaľ ide o obavy o dobré životné podmienky zvierat, metóda B.4 bola v roku 2004 zrevidovaná a umožňuje určiť poleptanie/podráždenie kože pomocou stratégie testovania na viacerých úrovniach s použitím validovaných testovacích metód *in vitro* alebo *ex vivo*, vďaka čomu sa vylúči bolesť a utrpenie zvierat. Tri validované testovacie metódy *in vitro* boli prijaté ako usmernenia OECD na vykonávanie testov 430, 431 a 435 (5) (6) (7) a dve z nich ako kapitoly B.40 a B.40a tejto prílohy a budú sa používať pri tej časti stratégie testovania na viacerých úrovniach metódy B.4 alebo usmernenia OECD na vykonávanie testov 404, ktorá sa týka poleptania (4).
3. Táto testovacia metóda sa týka koncového bodu podráždenia kože pre ľudské zdravie. Je založená na modeloch rekonštruovanej ľudskej pokožky, ktoré svojím celkovým usporiadaním (použitie netransformovaných keratinocytov získaných z ľudskej pokožky ako zdroja buniek a použitie reprezentatívneho tkaniva a cytoarchitektúry) dôkladne napodobňujú biochemické a fyziologické vlastnosti vrchnej časti ľudskej kože, t. j. epidermy. Táto testovacia metóda tiež zahŕňa súbor noriem výkonnosti (PS) (dodatok 2) na posudzovanie podobných a upravených testovacích metód založených na modeli rekonštruovanej ľudskej pokožky (RhE) Európskym centrom pre potvrdzovanie alternatívnych metód ES (ECVAM) (8) v súlade so zásadami usmerňujúceho dokumentu OECD č. 34 (9).
4. Požiadavkám tejto testovacej metódy vyhovujú tri validované metódy. Ukončili sa štúdie týkajúce sa postupov pred validáciou, optimalizácie a validácie pre metódu *in vitro* (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), ktorá používa model rekonštruovanej ľudskej pokožky a je komerčne dostupná ako EpiSkinTM (označuje sa ako validovaná referenčná metóda – VRM). Ďalšie dve komerčne dostupné metódy na podráždenie kože *in vitro*, a to metódy EpiDermTM SIT (EPI-200) a SkinEthicTM RHE (22), používajú modely rekonštruovanej ľudskej pokožky a vykázali podobné výsledky ako validovaná referenčná metóda podľa validácie založenej na normách výkonnosti (22).
5. Skôr ako sa na účely regulácie použije navrhovaná podobná alebo upravená metóda *in vitro* založená na modeli RhE, ktorá je iná ako validovaná referenčná metóda alebo metódy založené na modeli RhE EpiDermTM SIT (EPI-200) alebo SkinEthicTM, mala by sa stanoviť jej spoľahlivosť, relevantnosť (presnosť) a obmedzenia jej navrhovaného používania, aby sa zabezpečila jej porovnateľnosť s validovanou referenčnou metódou v súlade s požiadavkami noriem výkonnosti stanovenými v tejto testovacej metóde (dodatok 2). Okrem toho pred vytvorením alebo validovaním podobnej alebo upravenej metódy *in vitro* založenej na modeli RhE a jej predložením na prijatie regulačným orgánom (23) sa odporúča konzultovať dokument OECD, ktorý vysvetľuje základné informácie o testovaní podráždenia kože *in vitro*.

VYMEDZENIE POJMOV

6. Použité definície sú uvedené v dodatku 1.

ÚVODNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

7. Ako preukazuje validačná štúdia (16), obmedzením testovacej metódy je, že neumožňuje klasifikáciu chemikálií do nepovinnnej kategórie 3 (látky spôsobujúce mierne podráždenie) v zmysle GHS OSN (1). Keď sa táto metóda používa ako čiastočný náhradný test, možno bude potrebné vykonať následný test *in vivo*, aby sa dal úplne charakterizovať potenciál podráždenia kože (4 a kapitola B.4 tejto prílohy). Uznáva sa, že použitie ľudskej pokožky podlieha vnútroštátnym a medzinárodným etickým zásadám a podmienkam.
8. Táto testovacia metóda sa týka zložky podráždenia kože *in vitro* v rámci stratégie testovania na viacerých úrovniach metódy B.4 (usmernenie OECD o vykonávaní testov 404) týkajúcej sa podráždenia/poleptania kože (4). Keďže táto testovacia metóda neposkytuje dostatok informácií o poleptaní kože, treba poznamenať, že kapitola B.40a (usmernenie OECD o vykonávaní testov 431) o poleptaní kože je založená na tom istom systéme testovania na modeli RhE, no používa iný protokol (kapitola B.40a). Táto metóda je založená na modeloch rekonštruovanej ľudskej pokožky a používa ľudské keratinocyty, a preto predstavuje *in vitro* cieľový orgán druhov, ktoré sú predmetom záujmu. Okrem toho sa priamo vzťahuje na počiatočný krok zápalovej kaskády/zápalového akčného mechanizmu (poškodenie buniek a tkanív vedúce k lokálnej traume), ku ktorým dochádza počas podráždenia *in vivo*. V rámci validácie, ktoré je základom tejto testovacej metódy, bol otestovaný celý rad chemikálií a databáza validačnej štúdie obsahovala celkovo 58 chemikálií (16) (18) (23). To platí pre tuhé látky, kvapaliny, polotuhé látky a vosky. Kvapaliny môžu byť vodné alebo nevodné, tuhé látky môžu byť rozpustné alebo nerozpustné vo vode. Ak je to možné, tuhé látky sa pred aplikáciou rozdrvia na jemný prášok; iná predpríprava vzorky nie je potrebná. Plyny a aerosóly ešte neboli posúdené vo validačnej štúdii (24). Aj keď je možné, že tieto látky sa môžu testovať technológiou RhE, súčasná testovacia metóda neumožňuje testovanie plynov a aerosólov. Treba tiež poznamenať, že silno sfarbené chemikálie môžu narúšať merania životaschopnosti bunky a vyžadujú si použitie prispôbených kontrol na korekcie (pozri odseky 24 – 26).
9. Jeden pokus, ktorý sa skladá z troch replík tkaniva, by mal byť postačujúci na testovanie chemikálie, ak je jej klasifikácia jednoznačná. V prípadoch s hraničnými výsledkami, napríklad ak sa nezhodujú merania replík a/alebo ak sa percentuálny priemer životaschopnosti rovná $50 \pm 5\%$, treba zvážiť vykonanie druhého pokusu, ako aj tretieho pokusu, ak sa výsledky z prvých dvoch pokusov nezhodujú.

PRINCÍP TESTU

10. Testovaná chemikália sa lokálne aplikuje na trojrozmerný model RhE pozostávajúci z netransformovaných keratinocytov získaných z ľudskej pokožky, ktoré sa vykultivovali tak, aby vytvorili viacvrstvový, vysoko diferencovaný model ľudskej pokožky. Pozostáva z organizovanej bazálnej vrstvy, vrstvy ostnitých buniek a vrstvy zrnitých buniek a viacvrstvovej rohovitej vrstvy (*stratum corneum*) obsahujúcej medzibunkové lipidové lamelové vrstvy predstavujúce hlavné triedy lipidov, ktoré sú analogické vrstvám nachádzajúcim sa *in vivo*.

11. Podráždenie kože vyvolané chemikáliou, ktoré sa prejavuje erytémom a edémom, je výsledkom kaskády udalostí, ktoré sa začínajú prienikom do *stratum corneum* a poškodením hlbšie ležiacich vrstiev keratinocytov. Hynúce keratinocyty uvoľňujú mediátory, ktoré začnú zápalovú kaskádu pôsobiacu na bunky kože, najmä na stromálne a endotelové bunky. Dilatácia a zvýšená permeabilita endotelových buniek spôsobuje príznaky erytému a edému (24). Metódy založené na RhE merajú počiatočné udalosti v kaskáde.
12. Životaschopnosť buniek v modeloch RhE sa meria enzymatickou premenou vitálneho farbiva MTT [3-(4,5-dimetyl-tiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazólium-bromid, tiazoxylová modrá, číslo CAS 298-93-1]] na modrú formazánovú soľ, ktorá sa kvantitatívne meria po extrakcii z tkanív (25). Dráždivé chemikálie sa identifikujú na základe ich schopnosti spôsobiť pokles životaschopnosti buniek pod vymedzenú prahovú úroveň (t. j. $\leq 50\%$ pre kategóriu 2 GHS OSN/EÚ CLP). V závislosti od regulačného rámca, v ktorom sa výsledky tejto testovacej metódy používajú, chemikálie, ktoré spôsobujú zvýšenie životaschopnosti buniek nad vymedzenú prahovú úroveň, možno považovať za nedráždivé látky (t. j. $> 50\%$, bez kategórie).

PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

13. Predtým, ako sa začne bežne používať ktorákoľvek z troch validovaných metód, ktorá vyhovuje požiadavkám tejto testovacej metódy, laboratória by mali preukázať technickú spôsobilosť pomocou desiatich referenčných chemikálií uvedených v tabuľke 1. Pri podobných metódach vyvinutých v rámci tejto testovacej metódy alebo pri úpravách ktorejkoľvek z troch validovaných metód by sa mali splniť požiadavky noriem výkonnosti opísané v dodatku 2 k tejto testovacej metóde predtým, ako sa začnú používať na regulačné testovanie.
14. Ako súčasť postupu overovania spôsobilosti sa odporúča, aby používateľ overil bariérové vlastnosti tkanív po ich prijatí, ako to stanovuje tvorca modelu RhE. To je dôležité najmä vtedy, ak sa tkanivá zasielajú na veľkú vzdialenosť alebo počas dlhého časového obdobia. Po úspešnom stanovení metódy a preukázaní spôsobilosti na jej použitie už takéto overovanie nebude bežne potrebné. Pri pravidelnom používaní metódy sa však odporúča naďalej posudzovať bariérové vlastnosti v pravidelných intervaloch.

Tabuľka 1

Referenčné chemikálie ⁽¹⁾

Chemikália	Číslo CAS	Hodnota <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Fyzikálny stav	Kategória GHS OSN/EÚ CLP
Kyselina naftalénoctová	86-87-3	0	tuhá látka	bez kategórie
Izopropanol	67-63-0	0,3	kvapalina	bez kategórie
Metyl-stearát	112-61-8	1	tuhá látka	bez kategórie
Heptyl-butykrát	5870-93-9	1,7	kvapalina	bez kategórie (nepovinná kat. 3) ⁽³⁾ ⁽⁴⁾
Hexyl-salicylát	6259-76-3	2	kvapalina	bez kategórie (nepovinná kat. 3) ⁽³⁾ ⁽⁴⁾
3-p-kumenyl-2-metylpropanál	103-95-7	2,3	kvapalina	kat. 2
1-brómhexán	111-25-1	2,7	kvapalina	kat. 2
Hydroxid draselný (5 % roztok)	1310-58-3	3	kvapalina	kat. 2
1-metyl-3-fenyl-1-piperazín	5271-27-2	3,3	tuhá látka	kat. 2
Heptanál	111-71-7	3,4	kvapalina	kat. 2

⁽¹⁾ Tieto referenčné chemikálie patria do podskupiny referenčných chemikálií použitých vo validačnej štúdii.

⁽²⁾ Hodnotenie *in vivo* v súlade s kapitolou B.4 a usmernením OECD na vykonávanie testov 404 (4).

⁽³⁾ V rámci tejto testovacej metódy sa nepovinná kategória 3 (látky spôsobujúce mierne podráždenie) v zmysle GHS OSN (1) považuje za kategóriu 'bez kategórie'.

⁽⁴⁾ Nepovinná kategória 3 v zmysle GHS OSN sa v rámci EÚ CLP neuplatňuje.

POSTUP

15. Nasleduje opis zložiek a postupov metódy RhE na posúdenie podráždenia kože. Model RhE by sa mal zrekonštruovať a možno ho pripraviť interne alebo získať komerčne. K dispozícii sú štandardné pracovné postupy (SOP) pre EpiSkinTM, EpiDermTM SIT (EPI-200) a SkinEthicTM RHE (26) (27) (28). Testovanie by sa malo vykonať takto:

Zložky testovacej metódy RhE

Všeobecné podmienky

16. Na rekonštrukciu epitelu by sa mali použiť netransformované ľudské keratinocyty. Pod funkčnou vrstvou *stratum corneum* by sa malo nachádzať viac vrstiev životaschopných epitelových buniek (bazálna vrstva, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*). *Stratum corneum* by mala byť viacvrstvomá a obsahovať potrebný profil lipidov, aby sa vytvorila silná funkčná bariéra, ktorá odolá rýchlemu prenikaniu cytotoxických markerových chemikálií, ku ktorým patrí napr. dodecylsulfát sodný (SDS) alebo Triton X-100. Bariérovú funkciu treba preukázať a môže sa posudzovať buď stanovením koncentrácie, pri ktorej markerová chemikália znižuje životaschopnosť tkanív o 50 % (IC₅₀) po pevne stanovenom expozičnom čase, alebo stanovením expozičného času, ktorý je potrebný na zníženie životaschopnosti buniek o 50 % (ET₅₀) po aplikácii markerovej chemikálie v určitej pevne stanovenej koncentrácii. Izolačné vlastnosti modelu RhE by mali zabrániť prieniku materiálu okolo *stratum corneum* do životaschopného tkaniva, čo by viedlo k chybnému modelovaniu expozície kože. Model RhE by nemal byť kontaminovaný baktériami, vírusmi, mykoplazmami ani hubami.

Funkčné podmienky

Životaschopnosť

17. Skúška použitá na stanovenie stupňa životaschopnosti je skúška MTT (25). Používatelia modelu RhE by sa mali ubezpečiť, že každá šarža modelu RhE spĺňa kritériá stanovené pre negatívnu kontrolu (NC). Optická hustota (OD) samotného extrakčného rozpúšťadla by mala byť dostatočne malá, t. j. OD < 0,1. Rozsah prijateľnosti (horná a dolná hranica) pre hodnoty optickej hustoty pri negatívnej kontrole (v podmienkach testovacej metódy na podráždenie kože) stanovuje tvorca/dodávateľ modelu RhE a rozsahy prijateľnosti pre 3 validované metódy sú uvedené v tabuľke 2. Malo by sa zaznamenať, že tkanivá ošetrované negatívnou kontrolou sú počas expozičného obdobia testu stabilné v kultúre (zabezpečujú podobné výsledky merania životaschopnosti).

Tabuľka 2

Rozsahy prijateľnosti hodnôt optickej hustoty pri negatívnej kontrole

	Dolná hranica prijateľnosti	Horná hranica prijateľnosti
EpiSkin TM (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm TM SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic TM RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Bariérová funkcia

18. *Stratum corneum* a zloženie jej lipidov by mali byť schopné zabrániť rýchlemu prieniku cytotoxických markerových chemikálií, ku ktorým patrí napr. SDS alebo Triton X-100, podľa odhadu pomocou IC₅₀ alebo ET₅₀ (tabuľka 3).

Morfológia

19. Model RhE by sa mal histologicky preskúmať, aby sa preukázalo, že má štruktúru podobnú ľudskej pokožke (vrátane viacvrstvovej *stratum corneum*).

Reprodukovateľnosť

20. Výsledky pozitívnej kontroly (PC) a negatívnych kontrol (NC) testovacej metódy by mali preukázať reprodukovateľnosť v čase.

Kontrola kvality (QC)

21. Tvorca/dodávateľ modelu RhE by mal zabezpečiť a preukázať, že každá šarža použitého modelu RhE spĺňa stanovené kritériá na uvoľnenie do obehu, v rámci ktorých sú najvýznamnejšie kritériá životaschopnosti (odsek 17), bariérovej funkcie (odsek 18) a morfológie (odsek 19). Tieto údaje by sa mali poskytnúť používateľom metódy, aby mohli túto informáciu zahrnúť do správy o teste. Rozsah prijateľnosti (horná a dolná hranica) pre IC_{50} alebo ET_{50} by mal stanoviť tvorca/dodávateľ modelu RhE (alebo výskumný pracovník v prípade použitia interného modelu). Na spoľahlivú prognózu klasifikácie podráždenia sú prijateľné len tie výsledky, ktoré sa získali z kvalifikovaných tkanív. Ako príklad sa v tabuľke 3 uvádzajú rozsahy prijateľnosti pre tri validované metódy.

Tabuľka 3

Príklady kritérií kontroly kvality na uvoľnenie šarží do obehu

	Dolná hranica prijateľnosti	Horná hranica prijateľnosti
EpiSkin™ (SM) (18-hodinové ošetrovanie SDS) (26)	$IC_{50} = 1,0 \text{ mg/ml}$	$IC_{50} = 3,0 \text{ mg/ml}$
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % triton X-100) (27)	$ET_{50} = 4,8 \text{ hod.}$	$ET_{50} = 8,7 \text{ hod.}$
SkinEthic™ RHE (1 % triton X-100) (28)	$ET_{50} = 4,0 \text{ hod.}$	$ET_{50} = 9,0 \text{ hod.}$

Aplikácia testovaných a kontrolných chemikálií

22. Pri každej testovanej chemikálii a kontrolách by sa mali použiť aspoň tri repliky na jeden pokus. V prípade kvapalných aj pevných látok je potrebné na celý povrch kože rovnomerne naniesť dostatočné množstvo testovacej chemikálie, pričom je nutné sa vyhýbať nekonečnej dávke, t. j. malo by sa použiť minimálne $25 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ alebo $25 \text{ mg}/\text{cm}^2$. V prípade tuhých látok by sa mal pred aplikáciou povrch pokožky zvlhčiť deionizovanou alebo destilovanou vodou, aby sa tak zlepšil kontakt testovanej chemikálie s povrchom pokožky. Ak je to možné, tuhé látky by sa mali vždy testovať vo forme jemného prášku. Na konci expozičného času by sa testovaná chemikália mala dôkladne zmyť z povrchu pokožky tlmivým roztokom alebo 0,9 % roztokom NaCl. V závislosti od toho, ktorá z troch validovaných metód RhE sa použije, expozičný čas sa môže pohybovať v rozmedzí od 15 do 60 minút a inkubačná teplota v rozmedzí od 20°C do 37°C . Tento expozičný čas a teploty sa optimalizujú pre každú metódu RhE a zastupujú rôzne prirodzené vlastnosti týchto metód. Ďalšie informácie sa nachádzajú v štandardných pracovných postupoch pre metódy (26) (27) (28).
23. V každom pokuse by sa mali súbežne vykonať negatívne a pozitívne kontroly, aby sa preukázalo, že životaschopnosť (negatívna kontrola), bariérová funkcia a výsledná tkanivová citlivosť tkanív (pozitívna kontrola) sú v rámci stanoveného historického rozsahu prijateľnosti. Navrhovanou chemikáliou na pozitívnu kontrolu je 5 % vodný dodecylsulfát sodný (SDS). Navrhovanými chemikáliami na negatívnu kontrolu sú voda alebo fosfátom tlmený fyziologický roztok (PBS).

Merania bunkovej životaschopnosti

24. Najdôležitejším prvkom testovacieho postupu je to, že merania životaschopnosti sa nevykonávajú ihneď po expozícii testovaným chemikáliám, ale až po dostatočne dlhom inkubačnom čase po ošetroaní opláchnutých tkanív v čerstvom médiu. Tento čas umožňuje regeneráciu po slabých cytotoxických účinkoch, ako aj výskyt jasných cytotoxických účinkov. Počas fázy optimalizácie testu (11) (12) (13) (14) (15) sa ako optimálny ukázal byť 42-hodinový inkubačný čas po ošetroaní.
25. Skúška MTT je validovaná kvantitatívna metóda, ktorá by sa mala používať na meranie životaschopnosti buniek v rámci tejto testovacej metódy. Je vhodná na použitie v trojrozmernom modeli tkaniva. Vzorka tkaniva sa na 3 hodiny vloží do roztoku MTT s vhodnou koncentráciou (napr. $0,3 - 1 \text{ mg/mL}$). Pomocou rozpúšťadla (napr. izopropanol, kyslý izopropanol) sa potom z tkaniva extrahuje vyzrážaný modrý formazánový produkt, pričom koncentrácia formazánu sa odmeria stanovením optickej hustoty pri 570 nm pomocou priepustného pásmového filtra maximálne $\pm 30 \text{ nm}$.
26. Optické vlastnosti testovanej chemikálie alebo jej chemický účinok na MTT môžu interferovať so skúškou, čo vedie k nesprávnemu odhadu životaschopnosti (keďže testovaná chemikália môže zabráňovať procesu tvorby farby alebo ho zvrátiť, ale rovnako ho môže aj spôsobovať). K tomu môže dôjsť, keď sa špecifická testovacia chemikália úplne neodstráni z tkaniva pri oplachovaní alebo keď prenikne cez pokožku. Ak testovaná chemikália pôsobí priamo na MTT (redukcia MTT), je prirodzene zafarbená alebo sa zafarbí pri ošetrovaní tkaniva, mali by sa použiť ďalšie kontroly, aby sa zistilo, či nedochádza k interferencii testovanej chemikálie s technikou merania životaschopnosti, a aby sa táto prípadná interferencia upravila. Podrobný opis opravy priamej redukcie MTT a interferencií s farbivami sa nachádza v štandardných pracovných postupoch pre tri validované metódy (26) (27) (28).

Kritériá prijateľnosti

27. Pri každej metóde, pri ktorej sa používajú validované šarže modelu RhE (pozri odsek 21), by tkanivá ošetrované negatívnou kontrolou mali vykázať optickú hustotu, ktorá odráža kvalitu tkanív po všetkých krokoch zaslania a prijatia a po všetkých procesoch protokolu. Hodnoty optickej hustoty pri kontrole by nemali byť nižšie ako historicky stanovené hranice. Podobne by tkanivá ošetrované pozitívnou kontrolou, t. j. 5 % vodným SDS, mali odrážať ich schopnosť reagovať na dráždivú chemikáliu v podmienkach testovacej metódy (26) (27) (28). Mali by sa stanoviť súvisiace a vhodné opatrenia variability medzi replikami tkaniva [napr. ak sa použijú štandardné odchýlky (SD), mali by sa nachádzať v rámci jednostranného 95 % intervalu tolerance, ktorý sa vypočíta z historických údajov pre SD validovanej referenčnej metódy (VRM SD) < 18 %].

Interpretácia výsledkov a model na prognózy

28. Hodnoty optickej hustoty namerané pre každú testovanú chemikáliu sa môžu použiť na výpočet percentuálneho podielu životaschopnosti normalizovanej na negatívnu kontrolu, ktorá je stanovená na 100 %. Je potrebné jasne definovať, zdokumentovať a preukázať hraničnú percentuálnu hodnotu životaschopnosti buniek, ktorá rozlišuje medzi dráždivými chemikáliami a testovanými chemikáliami, ktoré nie sú klasifikované, a štatistickým(-i) postupom(-mi) použitým(-i) pri hodnotení výsledkov a identifikácii dráždivých chemikálií. Hraničné hodnoty prognózy podráždenia sú uvedené ďalej v texte:

- Testovaná chemikália sa pokladá za dráždivú pre kožu v súlade s kategóriou 2 GHS OSN/CLP EÚ, ak životaschopnosť tkaniva po expozícii a inkubácii po ošetroaní je menšia alebo rovná ($\leq$) 50 %.
- V závislosti od regulačného rámca, v ktorom sa výsledky tejto testovacej metódy používajú, testovanú chemikáliu možno považovať za nedráždivú pre kožu patriacu do kategórie 'bez kategórie' podľa GHS OSN/CLP EÚ, ak životaschopnosť tkaniva po expozícii a inkubácii po ošetroaní je väčšia ako (>) 50 %.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV*Údaje*

29. Pri každom pokuse je potrebné do tabuľky zaznamenať údaje z jednotlivých replík tkanív (napr. hodnoty optickej hustoty a vypočítaný percentuálny podiel životaschopnosti buniek pre každú testovanú chemikáliu vrátane klasifikácie) vrátane údajov o opakovaných pokusoch, ak je to vhodné. Okrem toho by sa mali pre každý pokus uvádzať aj stredné hodnoty $\pm$ štandardnej odchýlky (SD). Pozorované interakcie s reagentom MTT a zafarbenými testovanými chemikáliami by sa mali oznamovať pre každú testovanú chemikáliu.

Správa o teste

30. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testované a kontrolné chemikálie:

- chemický názov (chemické názvy), ako napríklad názov podľa CAS a číslo CAS, názov podľa EC a číslo EC, ak je známe,
- čistota a zloženie chemikálie (v hmotnostných percentách),
- fyzikálno-chemické vlastnosti relevantné na vykonanie štúdie (napr. fyzikálny stav, stabilita, prchavosť, hodnota pH a rozpustnosť vo vode, ak je známa),
- prípadná úprava testovaných/kontrolných chemikálií pred testovaním (napr. zahriatie, rozmletie),
- podmienky skladovania.

Zdôvodnenie použitého modelu RhE a protokolu

Podmienky testovania:

- použitý bunkový systém,
- úplné podporné údaje o použitom osobitnom modeli RhE vrátane jeho výkonnosti. K nim by mala patriť predovšetkým:
 - i) životaschopnosť;
 - ii) bariérová funkcia;
 - iii) morfológia;
 - iv) reprodukovateľnosť a predvídateľnosť;
 - v) kontroly kvality modelu (QC),
- podrobné informácie o použitom postupe testovania,
- použité testovacie dávky, trvanie expozície a inkubácie po ošetroaní,
- opis všetkých modifikácií testovacieho postupu,

- odkaz na historické údaje o modeli. K nim by mali patriť predovšetkým:
 - i) prijateľnosť údajov o kontrole kvality s odkazom na historické údaje o šaržiach;
 - ii) prijateľnosť hodnôt pozitívnych a negatívnych kontrol s odkazom na prostriedky a rozpätia pozitívnych a negatívnych kontrol,
- opis použitých hodnotiacich kritérií vrátane zdôvodnenia výberu hraničného bodu (hraničných bodov) pre model na prognózy,
- odkaz na historické kontrolné údaje.

Výsledky:

- údaje z individuálnych testovaných chemikálií pre meranie každého pokusu a každej repliky,
- indikácie kontrol použitých na priamu redukciu MTT a/alebo na zafarbenie testovaných chemikálií,
- opis ďalších pozorovaných účinkov.

Rozbor výsledkov

Záver

LITERATÚRA

1. UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, UN New York and Geneva. K dispozícii na stránke: [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', issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 April 2009. K dispozícii na stránke: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>].
3. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006 (Ú. v. EÚ L 353, 31.12.2008, s. 1).
4. OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 404, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [<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, Paris. K dispozícii na stránke: [<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, Paris. K dispozícii na stránke: [<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, Paris. K dispozícii na stránke: [<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)? K dispozícii na stránke: [<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, Paris. K dispozícii na stránke: [<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. and 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, 57 – 93.
11. Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and 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, 765 – 770.
12. Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004), Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests, *ALTEX* 21, 107 – 114.
13. Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and 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, 351 – 367.

14. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and 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, 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. and 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, 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. and 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, 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 . K dispozícii na stránke: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>].
18. Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, ATLA 35, 603 – 619.
19. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonnaud, E. and 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, 351 – 358.
20. EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. K dispozícii na stránke: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>].
21. EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. K dispozícii na stránke: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>].
22. EC-ECVAM (2008), Statement on the scientific validity of *in vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. K dispozícii na stránke: [<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, Paris. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html].
24. Welss, T., Basketter, D. A. and Schröder, K. R. (2004), *In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models, Toxicol. in Vitro 18, 231 – 243.
25. Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65, 55 – 63.
26. EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (February 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. K dispozícii na stránke: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>].
27. EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (Revised March 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). K dispozícii na stránke: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>].
28. SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. K dispozícii na stránke: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>].
29. Harvell, J. D., Lamminstusta, K., and Maibach, H. I. (1995), Irritant contact dermatitis, In: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.
30. Smernica Komisie 2001/59/ES zo 6. augusta 2001, ktorou sa po 28-krát prispôsobuje technickému pokroku smernica Rady 67/548/EHS o aproximácii zákonov, iných právnych predpisov a správnych opatrení týkajúcich sa klasifikácie, balenia a označenia nebezpečných látok (Ú. v. ES L 225, 21.8.2001, s. 1).
31. Basketter, D. A., York, M., McFadden, J. P. and Robinson, M. K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. Contact Dermatitis 51, 1 – 4.

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

Dodatok 1

Vymedzenie pojmov

Presnosť: Miera zhody výsledkov testovacej metódy s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o opatrenie výkonnosti testovacej metódy a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa ako synonymum pojmu ‚zhoda‘ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (9).

Životaschopnosť buniek: Parameter na meranie celkovej aktivity bunkovej populácie, ako napríklad schopnosť bunkových mitochondriálnych dehydrogenáz redukovať vitálne farbivo MTT [3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazólium bromid, tiazolylová modrá]), ktorý v závislosti od posledného meraného koncového bodu a od použitej koncepcie testu zodpovedá celkovému počtu a/alebo vitality živých buniek.

Zhoda: Ide o mieru výkonnosti testovacej metódy pre testovacie metódy, ktoré poskytujú kategorizačné výsledky, a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa používa ako synonymum pojmu presnosť a je vymedzený ako podiel všetkých testovaných chemikálií, ktoré sú správne klasifikované ako pozitívne alebo negatívne (9).

ET₅₀: Môže sa odhadnúť stanovením expozičného času potrebného na zníženie životaschopnosti buniek o 50 % pri použití markerovej chemikálie v špecifickej pevne určenej koncentrácii (pozri takisto IC₅₀).

CLP EÚ (nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí): Zavádza v Európskej únii (EÚ) systém GHS OSN klasifikácie a označovania chemických látok (látok a zmesí) (3).

GHS [Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemických látok Organizáciou Spojených národov (OSN)]: Systém navrhovania klasifikácie chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzickej, zdravotnej a environmentálnej nebezpečnosti a označovania pomocou príslušných komunikačných prvkov, ako sú piktogramy, signalizačné slová, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, ktoré obsahujú informácie o ich škodlivých účinkoch z hľadiska ochrany ľudí (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a záchranných zložiek) a životného prostredia (1).

IC₅₀: Môže sa odhadnúť stanovením koncentrácie, pri ktorej markerová chemikália znižuje životaschopnosť tkanív o 50 % (IC₅₀) po pevne stanovenom expozičnom čase (pozri takisto ET₅₀).

Nekonečná dávka: Množstvo testovanej chemikálie aplikovanej na pokožku, ktoré prekračuje množstvo potrebné na úplné a rovnomerné pokrytie povrchu pokožky.

Test me-too: Hovorový názov testovacej metódy, ktorá je štrukturálne a funkčne podobná validovanej a akceptovanej referenčnej testovacej metóde. Takáto testovacia metóda by bola kandidátom na ďalšiu validáciu. Môže sa používať namiesto podobnej testovacej metódy (9).

Normy výkonnosti (PS): Normy založené na validovanej testovacej metóde, ktoré slúžia ako základ na hodnotenie porovnateľnosti navrhovanej testovacej metódy, ktorá je mechanicky a funkčne podobná. Patria sem: i) nevyhnutné zložky testovacej metódy; ii) minimálny zoznam referenčných chemikálií vybraných spomedzi látok používaných na preukázanie prijateľnej výkonnosti validovanej testovacej metódy a iii) porovnateľné úrovne presnosti a spoľahlivosti založené na tom, čo sa získalo pre validovanú testovaciu metódu a čo by navrhovaná testovacia metóda mala preukázať pri hodnotení pomocou minimálneho zoznamu referenčných chemikálií (9).

Referenčné chemikálie: Chemikálie vybrané na použitie v procese validácie, pre ktorý už sú známe odozvy v referenčnom testovacom systéme *in vitro* alebo *in vivo* alebo odozvy u daných druhov zvierat. Tieto chemikálie by mali byť zástupcami tried chemikálií, v súvislosti s ktorými sa očakáva použitie testovacej metódy, a mali by zastupovať celý rozsah odoziev od silných po slabé alebo negatívne odozvy, ktoré možno očakávať od chemikálií, pri ktorých sa môže metóda použiť. Rôzne skupiny referenčných chemikálií sa môžu vyžadovať v rôznych štádiách procesu validácie a pre rôzne testovacie metódy a použitia testov (9).

Relevantnosť: Opis vzťahu testu k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej test správne meria alebo prognózuje biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testovacej metódy (9).

Spôľahlivosť: Meria rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda počas istého časového obdobia opakovane vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti (9).

Náhradný test: Test, ktorý predstavuje náhradu za test, ktorý sa bežne používa a je schválený na identifikáciu nebezpečnosti a/alebo hodnotenie rizika a o ktorom sa rozhodlo, že poskytuje rovnakú alebo zlepšenú úroveň ochrany zdravia ľudí alebo zvierat alebo životného prostredia v porovnaní so schváleným testom pre všetky možné testovacie situácie a chemikálie (9).

Citlivosť: Podiel všetkých pozitívnych/aktívnych testovaných chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky, a ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (9).

Podráždenie kože: Vytvorenie reverzibilného poškodenia kože po aplikácii testovanej chemikálie v trvaní do štyroch hodín. Podráždenie kože je lokálne vzniknutá, neimunogenetická reakcia, ktorá sa objaví krátko po stimulácii (29). Jeho charakteristickou vlastnosťou je reverzibilný proces, ku ktorému patria zápalové reakcie a väčšina klinických prejavov podráždenia charakteristických pre zápalový proces (erytém, edém, svrbenie a bolesť).

Špecifickosť: Podiel všetkých negatívnych/neaktívnych testovaných chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky, a ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (9).

Stratégia testovania na viacerých úrovniach: Testovanie, ktoré používa testovacie metódy na základe postupnosti; o testovacích metódach vybraných na každej po sebe nasledujúcej úrovni sa rozhoduje podľa výsledkov na predchádzajúcej úrovni testovania (9).

Testovaná chemikália (nazývaná aj testovaná látka): Akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Dodatok 2

Normy výkonnosti na posudzovanie navrhnutých podobných alebo upravených metód na podráždenie kože *in vitro* založených na modeli rekonštruovanej ľudskej pokožky (RhE)

ÚVOD

1. Cieľom noriem výkonnosti (PS) je oznámiť základ, na ktorom možno určiť, že nové testovacie metódy, chránené (t. j. chránené autorským právom, obchodnou značkou, registrované), ako aj nechránené sú dostatočne presné a spoľahlivé na konkrétne účely testovania. Tieto normy výkonnosti sú založené na validovaných a akceptovaných testovacích metódach a možno ich použiť na hodnotenie spoľahlivosti a presnosti ďalších podobných metód (hovorovo nazývaných testy „me-too“), ktoré sú založené na podobných vedeckých zásadách a merajú alebo prognózuju rovnaký biologický alebo toxický účinok (9).
2. Pred prijatím upravených metód (t. j. navrhnutých potenciálnych zlepšení schválenej metódy) je potrebné vykonať hodnotenie s cieľom stanoviť účinok navrhnutých zmien na výkonnosť testu a rozsah, v akom takéto zmeny ovplyvňujú informácie dostupné pre ďalšie zložky procesu validácie. V závislosti od počtu a povahy navrhovaných zmien, získaných údajov a sprievodnej dokumentácie k týmto zmenám by sa na ne mal vzťahovať rovnaký proces validácie, akým prechádza nový test, alebo prípadne obmedzené posúdenie spoľahlivosti a relevantnosti na základe zavedených noriem výkonnosti (9).
3. Podobné (me-too) alebo upravené metódy jednej z troch validovaných metód [EpiSkin™ (validovaná referenčná metóda – VRM), EpiDerm™ SIT (EPI-200) a SkinEthic™ RHE] navrhnuté v rámci tejto testovacej metódy by sa mali posúdiť s cieľom určiť ich spoľahlivosť a presnosť s použitím chemikálií, ktoré zastupujú celý rozsah výsledkov dráždivosti Draizovho testu. Pri hodnotení navrhovaných podobných alebo upravených metód pomocou 20 odporúčaných referenčných chemikálií noriem výkonnosti (tabuľka 1) by tieto metódy mali mať hodnoty spoľahlivosti a presnosti, ktoré sú porovnateľné alebo lepšie ako hodnoty odvodené z validovaných referenčných metód (tabuľka 2) (2) (16). Hodnoty presnosti a spoľahlivosti, ktoré by sa mali dosiahnuť, sa uvádzajú v odsekoch 8 až 12 tohto dodatku. Zaraďujú sa sem neklasifikované („bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP EÚ) aj klasifikované chemikálie (kategória 2 GHS OSN/CLP EÚ) (1), ktoré zastupujú rôzne chemické triedy, aby sa spoľahlivosť a presnosť (citlivosť, špecifickosť a celková presnosť) navrhovanej metódy mohli porovnať s hodnotami validovanej referenčnej metódy. Pred použitím metódy pri testovaní nových chemikálií je potrebné stanoviť jej spoľahlivosť, ako aj jej schopnosť správne identifikovať dráždivé chemikálie kategórie 2 GHS OSN/CLP EÚ a v závislosti od regulačného rámca, pre ktorý sa získavajú údaje, aj jej schopnosť správne identifikovať chemikálie „bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP EÚ.

4. Tieto normy výkonnosti sú založené na normách výkonnosti ES ECVAM (8), ktoré boli aktualizované podľa systémov klasifikácie a označovania GHS OSN a CLP EÚ (1) (3). Pôvodné normy výkonnosti boli vymedzené po dokončení validačnej štúdie (21) a sú založené na klasifikačnom systéme EÚ, ako ustanovuje smernica Komisie 2001/59/ES zo 6. augusta 2001, ktorou sa po 28-krát prispôsobuje technickému pokroku smernica Rady 67/548/EHS o aproximácii zákonov, iných právnych predpisov a správnych opatrení týkajúcich sa klasifikácie, balenia a označenia nebezpečných látok ⁽¹⁾. V dôsledku prijatia systému GHS OSN klasifikácie a označovania v EÚ (CLP EÚ) (3), ku ktorému došlo medzi ukončením validačnej štúdie a dokončením tejto testovacej metódy, sa normy výkonnosti aktualizovali (8). Táto aktualizácia sa týka najmä zmien: i) v skupine referenčných chemikálií v rámci noriem výkonnosti a ii) vymedzených hodnôt spoľahlivosti a presnosti (2) (23).

NORMY VÝKONNOSTI TESTOVACÍCH METÓD RHE NA PODRÁŽDENIE KOŽE *IN VITRO*

5. Normy výkonnosti zahŕňajú tieto tri zložky (9):

- I. Nevyhnutné zložky testovacej metódy
- II. Minimálny zoznam referenčných chemikálií
- III. Vymedzené hodnoty spoľahlivosti a presnosti.

I. Nevyhnutné zložky testovacej metódy

6. Skladajú sa z dôležitých štrukturálnych, funkčných a procedurálnych prvkov validovanej metódy, ktoré by mali byť zahrnuté do protokolu navrhovanej mechanicky a funkčne podobnej alebo upravenej metódy. Tieto zložky zahŕňajú jedinečné charakteristiky metódy, kritické procedurálne podrobnosti a opatrenia v oblasti kontroly kvality. Súlad s nevyhnutnými zložkami testovacej metódy prispeje k zabezpečeniu toho, aby podobná alebo upravená metóda bola založená na rovnakých koncepciách ako zodpovedajúca validovaná referenčná metóda (VRM) (9). Nevyhnutné zložky testovacej metódy sú podrobne opísané v odsekoch 16 až 21 testovacej metódy a testovanie by sa malo vykonať takto:

- Všeobecné podmienky (odsek 16)
- Funkčné podmienky, ktoré zahŕňajú:
 - životaschopnosť (odsek 17),
 - bariérovú funkciu (odsek 18),
 - morfológiu (odsek 19),
 - reprodukovateľnosť (odsek 20) a
 - kontrolu kvality (odsek 21).

II. Minimálny zoznam referenčných chemikálií

7. Referenčné chemikálie sa používajú na určenie toho, či spoľahlivosť a presnosť navrhovanej podobnej alebo upravenej metódy, o ktorej sa dokázalo, že sa štrukturálne a funkčne dostatočne podobá validovanej referenčnej metóde alebo mierne upravuje jednu z troch validovaných metód, sú porovnateľné alebo lepšie ako spoľahlivosť a presnosť validovanej referenčnej metódy (2) (8) (16) (23). V tabuľke 1 je zahrnutých 20 odporúčaných referenčných chemikálií, ktoré zastupujú rôzne chemické triedy (t. j. chemické kategórie založené na funkčných skupinách), ako aj celý rozsah výsledkov dráždivosti Draizovho testu (od neдрáždiacich až po silne dráždiace chemikálie). Chemikálie zahrnuté do tohto zoznamu pozostávajú z 10 chemikálií kategórie 2 podľa GHS OSN/CLP EÚ a 10 chemikálií 'bez kategórie', z ktorých 3 patria do nepovinnnej kategórie 3 v zmysle GHS OSN. V rámci tejto testovacej metódy sa nepovinná kategória 3 považuje za kategóriu 'bez kategórie'. Chemikálie uvedené v tabuľke 1 sú vybrané z chemikálií použitých vo fáze optimalizácie, ktorá nasledovala po fáze pred validáciou, a vo validačnej štúdii validovanej referenčnej metódy, pokiaľ ide o funkčný a fyzikálny stav chemikálie (14) (18). Tieto referenčné chemikálie zastupujú minimálny počet chemikálií, ktoré by sa mali použiť na hodnotenie presnosti a spoľahlivosti navrhovanej podobnej alebo upravenej metódy, ale nemali by sa používať na vývoj nových metód. V prípade, keď uvedená chemikália nie je k dispozícii, môžu sa použiť iné chemikálie, pre ktoré existujú dostatočné referenčné údaje *in vivo*, najmä chemikálie, ktoré boli použité vo fáze optimalizácie nasledujúcej po fáze pred validáciou alebo vo validačnej štúdii validovanej referenčnej metódy. Ak je to žiaduce, môžu sa do minimálneho zoznamu referenčných chemických látok doplniť ďalšie chemikálie, ktoré predstavujú ostatné chemické triedy a pre ktoré sú dostupné dostatočné referenčné údaje *in vivo*, aby sa tak mohla ďalej hodnotiť presnosť navrhovanej metódy.

⁽¹⁾ Ú. v. ES L 225, 21.8.2001, s. 1.

Tabuľka 1

Minimálny zoznam referenčných chemických látok na stanovenie hodnôt presnosti a spoľahlivosti podobných alebo upravených metód na podráždenie kože založených na modeli rekonštruovanej ľudskej pokožky ⁽¹⁾

Chemikália	Číslo CAS	Fyzikálny stav	Hodnota in vivo	VRM kat. in vitro	GHS OSN/CLP EÚ kat. in vivo
1-bróm-4-chlórbután	6940-78-9	kvapalina	0	kat. 2	bez kategórie
Dietylftalát	84-66-2	kvapalina	0	bez kategórie	bez kategórie
Kyselina naftalénoctová	86-87-3	tuhá látka	0	bez kategórie	bez kategórie
Alyl-fenoxyacetát	7493-74-5	kvapalina	0,3	bez kategórie	bez kategórie
Izopropanol	67-63-0	kvapalina	0,3	bez kategórie	bez kategórie
4-(metylsulfanyl)benzaldehyd	3446-89-7	kvapalina	1	kat. 2	bez kategórie
Metyl-stearát	112-61-8	tuhá látka	1	bez kategórie	bez kategórie
Heptyl-butyrát	5870-93-9	kvapalina	1,7	bez kategórie	bez kategórie
Hexyl-salicylát	6259-76-3	kvapalina	2	bez kategórie	bez kategórie
(E)-3-fenylpropenál	104-55-2	kvapalina	2	kat. 2	bez kategórie (nepovinná kat. 3) ⁽³⁾
1-dekanol ⁽²⁾	112-30-1	kvapalina	2,3	kat. 2	kat. 2
3-p-kumenyl-2-metylpropanál	103-95-7	kvapalina	2,3	kat. 2	kat. 2
1-brómhexán	111-25-1	kvapalina	2,7	kat. 2	kat. 2
2-chlórmetyl-3,5-dimetyl-4-metoxypyridín HCl	86604-75-3	tuhá látka	2,7	kat. 2	kat. 2
Dipropyldisulfán ⁽²⁾	629-19-6	kvapalina	3	bez kategórie	kat. 2
Hydroxid draselný (5 % roztok)	1310-58-3	kvapalina	3	kat. 2	kat. 2
Benzénetiol, 5-(1,1 dimetyletyl)-2-metyl	7340-90-1	kvapalina	3,3	kat. 2	kat. 2
1-metyl-3-fenyl-1-piperazín	5271-27-2	tuhá látka	3,3	kat. 2	kat. 2
Heptanál	111-71-7	kvapalina	3,4	kat. 2	kat. 2
Tetrachlóretylén	127-18-4	kvapalina	4	kat. 2	kat. 2

⁽¹⁾ Výber chemikálií je založený na týchto kritériách: i) chemikálie sú komerčne dostupné; ii) zastupujú celý rad výsledkov dráždivosti Draizovho testu (od nedráždiacich až po silne dráždiace); iii) majú dobre definovanú chemickú štruktúru; iv) reprezentujú chemickú funkčnosť použitú v procese validácie a v) nesúvisia s extrémne toxickým profilom (napr. karcinogénnym alebo toxickým pre reprodukčný systém) a nesúvisia s obmedzujúcimi nákladmi na zneškodnenie.

⁽²⁾ Chemikálie, ktoré spôsobujú podráždenie u králikov, ale u ktorých je spoľahlivo dokázané, že nespôsobujú podráždenie u ľudí (31) (32) (33).

⁽³⁾ Podľa GHS OSN, nie podľa EÚ CLP.

III. Vymedzené hodnoty spoľahlivosti a presnosti

8. Na účely stanovenia spoľahlivosti a relevantnosti navrhovaných podobných alebo upravených metód, ktoré by sa mali prenášať medzi laboratóriami, je potrebné aspoň v troch laboratóriách otestovať všetkých 20 referenčných chemikálií, ktoré sú uvedené v tabuľke 1. Ak sa však navrhovaná metóda má používať iba v jednom laboratóriu, multilaboratórne testovanie nebude na jej validáciu potrebné. Je však nevyhnutné, aby takéto validačné štúdie nezávisle posúdili medzinárodne uznávané validačné orgány v súlade s medzinárodnými usmerneniami (9). V každom laboratóriu by sa všetkých 20 referenčných chemikálií malo testovať v troch nezávislých pokusoch vykonaných s rôznymi šaržami tkaniva v dostatočných časových odstupoch. Každý pokus by mal obsahovať minimálne tri súbežne testované repliky tkaniva pre každú zapojenú testovanú chemikáliu, negatívnu kontrolu a pozitívnu kontrolu.
9. Pri výpočte hodnôt spoľahlivosti a presnosti navrhovanej metódy by sa mali spoločne zväziť všetky štyri kritériá uvedené nižšie, čím sa zabezpečí, že hodnoty spoľahlivosti a relevantnosti sú vypočítané vopred vymedzeným a konzistentným spôsobom:
 1. Na výpočet variability a schopnosti prognózy (presnosti) metódy v rámci laboratória a medzi laboratóriami sa použijú iba tie údaje, ktoré pochádzajú z úplnej série pokusov.
 2. Konečná klasifikácia každej referenčnej chemikálie v každom zúčastnenom laboratóriu by sa mala získať použitím strednej hodnoty životaschopnosti počas rôznych pokusov v rámci úplnej série pokusov.
 3. Na výpočet medzilaboratórnej variability metódy sa použijú iba údaje pre tie chemikálie, s ktorými boli vykonané úplné série pokusov vo všetkých zúčastnených laboratóriách.
 4. Výpočet hodnôt presnosti by mal byť založený na jednotlivých laboratórnych prognózach získaných pre 20 referenčných chemikálií v rôznych zúčastnených laboratóriách.

V tomto kontexte sa **séria pokusov** skladá z troch nezávislých pokusov s jednou testovanou chemikáliou z jedného laboratória. **Úplná séria pokusov** je séria pokusov s jednou testovanou chemikáliou z jedného laboratória, pričom všetky tri pokusy sú platné. To znamená, že jediný neplatný pokus ruší platnosť celej série troch pokusov.

Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť

10. Hodnotenie vnútrolaboratórnej reprodukovateľnosti by malo dokázať súlad s klasifikáciami (kategória 2 a „bez kategórie“ v zmysle GHS OSN/CLP EÚ) získanými pri iných, nezávislých pokusoch s 20 referenčnými chemikáliami v rámci jedného laboratória, ktorý je vyšší ako alebo sa rovná ($\geq$) 90 %.

Medzilaboratórna reprodukovateľnosť

11. Hodnotenie medzilaboratórnej reprodukovateľnosti nie je nevyhnutné, ak sa navrhovaná metóda používa len v jednom laboratóriu. Pre metódy, ktoré sa budú prenášať medzi laboratóriami, by mal byť súlad s klasifikáciami (kategória 2/„bez kategórie“ v zmysle GHS OSN/CLP EÚ) získanými pri rôznych, nezávislých pokusoch s 20 referenčnými chemikáliami najlepšie medzi minimálne tromi laboratóriami vyšší ako alebo sa rovná ($\geq$) 80 %.

Schopnosť prognózy (presnosť)

12. Presnosť (citlivosť, špecifickosť a celková presnosť) navrhovanej podobnej alebo upravenej metódy by mala byť porovnateľná alebo lepšia ako presnosť validovanej referenčnej metódy, pričom sa berú do úvahy dodatočné informácie týkajúce sa relevantnosti pri druhoch, ktoré sú predmetom záujmu (tabuľka 2). Citlivosť by sa mala rovnáť alebo by mala byť väčšia ($\geq$) ako 80 % (2) (8) (23). Citlivosti navrhovanej metódy *in vitro* sa však týka ďalšie konkrétne obmedzenie vzhľadom na to, že len dve chemikálie *in vivo* kategórie 2, 1-dekanol a dipropylsulfán, môžu byť viac ako jedným zúčastneným laboratóriom nesprávne klasifikované ako chemikálie „bez kategórie“. Špecifickosť by sa mala rovnáť alebo by mala byť väčšia ($\geq$) ako 70 % (2) (8) (23). Neexistuje ďalšie obmedzenie, pokiaľ ide o špecifickosť navrhovanej metódy *in vitro*, t. j. každé zúčastnené laboratórium môže nesprávne klasifikovať ktorúkoľvek chemikáliu *in vivo* ako chemikáliu „bez kategórie“, pokiaľ sa konečná špecifickosť testovacej metódy nachádza v prijateľnom rozsahu. Celková presnosť by sa mala rovnáť alebo by mala byť väčšia ($\geq$) ako 75 % (2) (8) (23). Aj keď citlivosť validovanej referenčnej metódy vypočítaná pre 20 referenčných chemikálií uvedených v tabuľke 1 sa rovná 90 %, vymedzená hodnota minimálnej citlivosti požadovanej pre akúkoľvek podobnú alebo upravenú metódu, ktorá sa má považovať za validovanú, je stanovená na 80 %, keďže 1-dekanol (hraničná chemikália) aj dipropylsulfán (falošný negatívny výsledok validovanej referenčnej metódy) sú známe tým, že nespôsobujú podráždenie kože u ľudí (31) (32) (33), aj keď boli identifikované ako dráždivé v teste s kráľikmi. Keďže modely RhE sú založené na bunkách ľudského pôvodu, môže sa predpokladať, že tieto chemikálie nespôsobujú podráždenie („bez kategórie“ v zmysle GHS OSN/CLP EÚ).

Tabuľka 2

Požadované predpokladané hodnoty citlivosti, špecifickosti a celkovej presnosti potrebné na to, aby sa každá podobná alebo upravená metóda mohla považovať za validovanú

Citlivosť	Špecifickosť	Celková presnosť
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Kritériá schválenia štúdie

13. Je možné, že jeden alebo viacero testov týkajúcich sa jednej alebo viacerých testovaných chemikálií nespĺňa kritériá na schválenie testu a kontrolných chemikálií alebo nie je prijateľný(-ých) z iných dôvodov. Na doplnenie chýbajúcich údajov pri každej testovanej chemikálii sú prijateľné maximálne dva doplňujúce testy (opakované testovanie). Presnejšie povedané, keďže v prípade opakovaného testovania je potrebné súbežne testovať aj negatívne a pozitívne kontroly, možno vykonať maximálne dva ďalšie pokusy pre každú testovanú chemikáliu.
14. Je možné, že ani po opakovanom testovaní sa nepodarí získať minimálny počet troch platných pokusov požadovaných pre každú testovanú chemikáliu v prípade každej referenčnej chemikálie v každom zúčastnenom laboratóriu, čo bude viesť k neúplnej matici údajov. V takýchto prípadoch, aby bolo možné považovať tieto súbory údajov za prijateľné, treba splniť všetky tieto tri kritériá:
 1. So všetkými 20 referenčnými chemikáliami by mala byť vykonaná aspoň jedna úplná séria pokusov.
 2. V každom z minimálne troch zúčastnených laboratórií musia úplné série pokusov predstavovať aspoň 85 % (pre 20 chemikálií, t. j. 3 neplatné série pokusov v jednom laboratóriu sú prijateľné).
 3. Minimálne v troch laboratóriách musí zo všetkých možných sérií pokusov aspoň 90 % predstavovať úplné série pokusov (pre 20 chemikálií testovaných v troch laboratóriách; t. j. 6 neplatných sérií pokusov v jednom laboratóriu je prijateľných).“
3. Doplňajú sa tieto kapitoly:

„B.49. IN VITRO TEST MIKROJADIER BUNIEK CICAVCOV

ÚVOD

1. *In vitro* skúška mikrojadier (MNvit) je genotoxický test, ktorého cieľom je zistiť prítomnosť mikrojadier (MN) v cytoplazme buniek v interfáze. Mikrojadrá môžu pochádzať z acentrických fragmentov chromozómov (t. j. bez centroméry) alebo z celých chromozómov, ktoré počas anafázy delenia bunky nie sú schopné migrovať k pólom. Skúška zisťuje aktivitu klastogénnych a aneugénnych chemikálií (látok a zmesí) (1) (2) v bunkách, ktoré prešli bunkovým delením počas expozície testovanej látky alebo po nej. Táto testovacia metóda (TM) umožňuje využívať protokoly s inhibítorom polymerizácie aktínu, ktorý sa nazýva cytochalasín B (cytoB), a bez neho. Pridanie cytoB pred cieľovou mitózou umožňuje identifikovať a selektívne analyzovať frekvenciu mikrojadier v bunkách, ktoré ukončili jednu mitózu, keďže tieto bunky sú dvojjadrové (3) (4). Táto testovacia metóda tiež umožňuje využiť protokoly bez blokovania cytokinézy, ak existuje dôkaz, že populácia analyzovaných buniek prešla mitózou.
2. Okrem použitia skúšky MNvit na identifikáciu chemikálií (látok a zmesí), ktoré indukujú mikrojadrá, môže použitie inhibítorov cytokinézy, imunochemického označovania kinetochorov alebo hybridizácia s centromérovými/telomérovými sondami [fluorescenčná hybridizácia *in situ* (FISH)] tiež poskytnúť informácie o mechanizmoch poškodenia chromozómov a tvorbe mikrojadier (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Postupy označovania a hybridizácie možno použiť, ak dôjde k zvýšenej miere tvorby mikrojadier a výskumník chce určiť, či je tento nárast výsledkom klastogénnych a/alebo aneugénnych procesov.
3. Mikrojadrá predstavujú poškodenie, ktoré sa prenáša na dcérske bunky, zatiaľ čo chromozómové odchýlky zaznamenané v bunkách v metafáze nemožno preniesť. Keďže mikrojadrá v bunkách v interfáze možno hodnotiť relatívne objektívne, pracovníci laboratória musia určiť len to, či bunky prešli, alebo neprešli delením a koľko buniek obsahuje mikrojadro. Následne možno preparáty pomerne rýchlo vyhodnotiť a analýzu možno vykonať automaticky. Takto sa počas jedného ošetrenia môžu vyhodnotiť prakticky tisíce, a nielen stovky buniek, čím sa zvyšuje účinnosť skúšky. Nakoniec keďže mikrojadrá môžu vzniknúť v dôsledku spomalenia vzniku chromozómov, existuje možnosť zistiť činitele indukujúce aneuploidy, ktoré je zložité skúmať pomocou bežných testov chromozómových odchýlok, napr. usmernenie OECD o vykonávaní testov 473 (kapitola B.10 tejto prílohy) (17). Skúška MNvit však neumožňuje rozlišovať chemikálie indukujúce vznik polyploidov od tých chemikálií, ktoré indukujú klastogenicitu bez použitia špeciálnych postupov, ako napríklad fluorescenčnej hybridizácie *in situ* (FISH) opísanej v odseku 2.

4. Skúška MNvit je metóda *in vitro*, ktorá bežne využíva kultivované ľudské bunky alebo bunky hlodavcov. Poskytuje komplexný základ skúmania potenciálu poškodenia chromozómov *in vitro*, keďže možno zistiť aneugény, ako aj klastogény.
5. Skúška MNvit je spoľahlivá a účinná v prípade rôznych druhov buniek, a to s použitím alebo bez použitia cytoB. Platnosť skúšky MNvit podporuje množstvo údajov získaných z rôznych bunkových línií hlodavcov (CHO, V79, CHL/IU, a L5178Y) a ľudských lymfocytov (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Tieto údaje zahŕňajú najmä medzinárodné validačné štúdie, ktoré koordinovalo združenie Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22), a správy z medzinárodného seminára o testovaní genotoxicity (International Workshop on Genotoxicity Testing) (4) (16). Dostupné údaje boli opätovne prehodnotené vzhľadom na závažnosť dôkazov retrospektívnej validačnej štúdie, ktorú uskutočnilo Európske centrum pre validáciu alternatívnych metód (ECVAM) Európskej komisie, pričom táto testovacia metóda bola Vedeckým poradným výborom ECVAM (ESAC) schválená ako vedecky platná (32) (33) (34). Použitie ľudskej lymfoblastoidnej bunkovej línie TK6 (35), buniek HepG2 (36) (37) a primárnych embryonálnych buniek škrečka sýrskeho (38) bolo síce opísané, neboli však použité vo validačných štúdiách.

VYMEDZENIE POJMOV

6. Použité definície sú uvedené v dodatku 1.

ÚVODNÉ ÚVAHY

7. Testy, ktoré sa vykonávajú *in vitro*, si zvyčajne vyžadujú použitie exogénneho zdroja metabolickej aktivácie okrem prípadov, keď sú bunky v súvislosti s testovanými látkami metabolicky spôsobilé. Exogénny systém metabolickej aktivácie napodobňuje v plnej miere podmienky *in vivo*. Rovnako je potrebné predchádzať podmienkam, ktoré by viedli k falošným pozitívnym výsledkom, ktoré neodrážajú vnútornú mutagenitu a môžu vzniknúť v dôsledku takých faktorov, ako napríklad výrazné zmeny v hodnotách pH alebo osmolality alebo z dôvodu vysokej úrovne cytotoxicity (39) (40) (41). Ak testovaná chemikália spôsobí zmenu v hodnote pH média v čase prídania, je potrebné pH upraviť tľmením zásobného roztoku tak, aby všetky objemy pri všetkých testovacích koncentráciách a pri všetkých kontrolách ostali rovnaké.
8. Pri analýze indukcie mikrojadier je dôležité, aby mitóza prebehla v ošetrovaných aj v neošetrovaných kultúrach. Najinformatívnejšie štádium pre hodnotenie mikrojadier je v bunkách, ktoré ukončili jednu mitózu počas ošetrovania testovanou látkou alebo po ošetrovaní.

PRINCÍP TESTU

9. Bunkové kultúry ľudského pôvodu alebo pochádzajúce z cicavcov sú vystavené testovanej látke s exogénnym zdrojom metabolickej aktivácie aj bez neho okrem prípadu, ak sú použité bunky s dostatočnou schopnosťou metabolizácie. Súčasťou každého testu sú chemikálie na súbežné kontroly s rozpúšťadlom/nosičom (VC) a chemikálie na pozitívnu kontrolu (PC).
10. Počas expozície testovanej látke alebo po expozícii sa bunky pestujú dostatočne dlho na to, aby sa umožnilo, že poškodenie chromozómov alebo deliaceho vretienka povedie k vytvoreniu mikrojadier v bunkách v interfáze. Na indukciu aneuploidie je zvyčajne potrebné, aby bola testovaná látka prítomná počas mitózy. Získané a zafarbené bunky v interfáze sa analyzujú na prítomnosť mikrojadier. V ideálnom prípade by sa mali mikrojadrá hodnotiť len v tých bunkách, ktoré počas expozície testovanej látke alebo v čase po expozícii ukončili mitózu. Ak boli kultúry ošetrované blokátorom cytokinézy, rovnaký výsledok sa dosiahne hodnotením len dvojjadrových buniek. Ak sa blokátor cytokinézy nepoužije, je dôležité preukázať, že analyzované bunky pravdepodobne prešli delením počas expozície testovanej látke alebo po nej. Pri všetkých protokoloch je dôležité preukázať, že došlo k proliferácii buniek v kontrolných, ako aj v ošetrovaných kultúrach, a rozsah cytotoxicity alebo cytostázy, ktorú vyvolala testovaná látka, je potrebné posúdiť v rámci kultúr (alebo v súbežných kultúrach), ktoré sa hodnotia z hľadiska mikrojadier.

OPIS SKÚŠKY

Prípravy

11. Môžu sa použiť kultivované primárne ľudské periférne krvné lymfocyty (5) (19) (42) (43) a rôzne bunkové línie hlodavcov, ako napríklad bunky CHO, V79, CHL/IU a L5178Y (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Použitie iných bunkových línií a typov je potrebné zdôvodniť na základe ich preukázanej výkonnosti v skúške, ako sa uvádza v oddiele Kritériá prijateľnosti. Keďže požadovaná frekvencia mikrojadier ovplyvní citlivosť skúšky, odporúča sa použiť druhy buniek, ktoré majú nízku, stabilnú požadovú frekvenciu tvorby mikrojadier.

12. Ľudské periférne krvné lymfocyty je potrebné získať od mladých (od 18 do 35 rokov) zdravých nefajčiarov, ktorí v poslednom čase neboli vystavení genotoxickým chemikáliám alebo rádiácii. Ak sa pre jedno použitie spoja bunky od viacerých darcov, mal by sa uviesť ich počet. Frekvencia mikrojadier sa s vekom zvyšuje, pričom tento trend je viac viditeľný u žien než u mužov (44) a treba to zohľadniť pri výbere darcovských buniek na spájanie.

Médiá a podmienky kultivácie

13. Na udržiavanie kultúr sú potrebné vhodné kultivačné médiá a inkubačné podmienky (kultivačné nádoby, koncentrácia CO₂, teplota a vlhkosť). Získané bunkové línie a kmene by sa mali pravidelne kontrolovať, pokiaľ ide o stabilitu modálneho počtu chromozómov a o to, či nedošlo ku kontaminácii mykoplazmou. V prípade kontaminácie alebo zmeny modálneho počtu chromozómov by sa nemali používať. Mal by byť známy čas bežného bunkového cyklu pre podmienky použitých kultúr v testovacom laboratóriu. Ak sa použije metóda blokovania cytokínézy, je potrebné optimalizovať koncentráciu inhibítora cytokínézy vzhľadom na príslušný druh bunky a mala by vykazovať tvorbu dostatočného počtu dvojjadrových buniek na hodnotenie.

Príprava kultúr

14. Zistené bunkové línie a kmene: bunky sa odoberú z uskladnených kultúr, zapustia sa do kultivačného média v takej hustote, pri ktorej kultúry nedosiahnu zhĺuk v monovrstvách, a suspenzné kultúry nedosiahnu nadmernú hustotu pred časom zberu a inkubujú sa pri teplote 37 °C.
15. Lymfocyty: celá krv ošetrovaná antikoagulantom (napr. heparínom) alebo oddelené lymfocyty sa pred expozíciou testovanej látky a cytoB kultivujú v prítomnosti mitogénu (napr. fytohemaglutinínu).

Metabolická aktivácia

16. Ak sa použijú bunky s nedostatočnou endogénnou metabolickou kapacitou, je potrebné použiť exogénny systém metabolickej aktivácie. Najpoužívanejším systémom je postmitochondriálna frakcia podporená spolufaktorom (S9), pripravená z pečene hlodavcov ošetrovaných činidlami na indukciu enzýmov, ako je napríklad Aroclor 1254 (45) (46) alebo zmes fenobarbitonu a β-naftoflavónu (46) (47) (48) (49). Druhá kombinácia nie je v rozpore so Štokholmským dohovorom o perzistentných organických látkach (50) ani nariadením (ES) č. 850/2004 o perzistentných organických znečisťujúcich látkach (66), pričom sa pri indukovaní oxidáz so zmiešanými funkciami preukázala ako rovnako účinná ako Aroclor 1254 (46) (47) (48) (49). Frakcia S9 sa v konečnom testovacom médiu zvyčajne používa v koncentráciách v rozpätí od 1 % – 10 % (objemové percentá). Stav systému metabolickej aktivácie môže závisieť od triedy testovanej chemikálie. V niektorých prípadoch môže byť vhodné využiť viac než jednu koncentráciu S9.
17. Geneticky získané bunkové línie vyjadrujúce špecifické ľudské aktivačné enzýmy alebo aktivačné enzýmy hlodavcov môžu znížiť potrebu exogénneho systému metabolickej aktivácie a možno ich použiť ako testovacie bunky. V takýchto prípadoch by mal byť výber použitých bunkových línií vedecky podložený, napr. relevantnosťou oxidáz so zmiešanými funkciami pre metabolizmus testovanej látky (51) a ich schopnosťou odozvy na známe klastogény a aneugény (pozri samostatný oddiel Kritériá prijateľnosti). Je potrebné uviesť, že testovanú látku nemusí(-ia) nevyhnutne metabolizovať vyjadrená(-é) oxidáza(-y) so zmiešanými funkciami. V tomto prípade by negatívne výsledky nesvedčili o tom, že testovaná látka nie je schopná indukovať mikrojadrá.

Príprava testovanej látky

18. Chemikálie v tuhom skupenstve by sa pred ošetrením buniek mali rozpustiť v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch a v prípade potreby rozriediť. Kvapalné chemikálie sa pred ošetrením môžu pridať priamo do testovacích systémov a/alebo rozriediť. Plyny alebo prchavé chemikálie by sa mali testovať pomocou vhodných úprav štandardných protokolov, ako napríklad ošetrovanie v uzavretých nádobách (52) (53). Používajú sa čerstvé preparáty testovanej látky okrem prípadu, keď údaje o stabilite preukazujú prijateľnosť uskladnenia.

Podmienky testu

Rozpúšťadlá/nosiče

19. Rozpúšťadlo/nosič by nemal reagovať s testovanou látkou a nemal by byť ani nekompatibilný s prežitím buniek alebo so zachovaním aktivity S9 pri použitej koncentrácii. Ak sa používajú iné ako riadne zaužívané rozpúšťadlá/nosiče (napríklad voda, bunkové kultivačné médium, dimetylsulfoxid), ich použitie by malo byť podložené údajmi označujúcimi ich kompatibilitu s testovanou látkou a absenciou genetickej toxicity. Odporúča sa, aby sa vždy, keď je to možné, najskôr zvažilo použitie vodného rozpúšťadla/nosiča.

Použitie cytoB ako blokátora cytokinézy

20. Jedným z najdôležitejších faktorov pri skúške MNvit je zaistenie toho, aby hodnotené bunky prešli mitózou počas ošetrovania alebo v inkubačnej dobe po ošetrovaní, ak sa použije. CytoB je najbežnejšie používané činidlo na blokovanie cytokinézy, pretože tlmí vytváranie aktínu, a tým zabraňuje rozdeľovaniu dcérskych buniek po mitóze, čo vedie k vytváraniu dvojjadrových buniek (5) (54) (55). Hodnotenie mikrojadier preto možno obmedziť len na tie bunky, ktoré prešli mitózou počas ošetrovania alebo po ňom. Zároveň je možné merať účinok testovanej látky na kinetiku proliferácie buniek. CytoB sa používa na blokovanie cytokinézy pri použití ľudských lymfocytov, pretože v rámci kultúr, ako aj medzi rôznymi darcami sú dĺžky bunkových cyklov nepravidelné a nie všetky lymfocyty reagujú na PHA. Pri testovaní bunkových línií s cieľom stanoviť, či sa hodnotené bunky delili, boli použité iné metódy, ktoré sú uvedené nižšie (pozri odsek 26).
21. Vhodnú koncentráciu cytoB pre každý druh buniek by malo stanoviť laboratórium a tak sa dosiahne optimálna frekvencia dvojjadrových buniek v kontrolných kultúrach s rozpúšťadlom/nosičom. Vhodná koncentrácia cytoB je zvyčajne medzi 3 až 6 µg/ml.

Meranie proliferácie buniek a cytotoxicity a výber expozičných koncentrácií

22. Pri stanovovaní najvyššej koncentrácie testovanej látky je potrebné vyhýbať sa koncentráciám, ktoré majú schopnosť vyvolať falošné pozitívne odozvy, ako napríklad vytváranie nadmernej cytotoxicity, zraňovanie kultivačného média a výrazné zmeny v hodnote pH alebo osmolality (39) (40) (41).
23. Vykonávajú sa merania proliferácie buniek, aby sa zaistilo, že ošetrované bunky prešli mitózou počas skúšky a že ošetrovania sa vykonali na vhodných úrovniach cytotoxicity (pozri odsek 29). Cytotoxicita by sa mala stanoviť pomocou metabolickej aktivácie a bez nej v bunkách, ktoré si vyžadujú metabolickú aktiváciu s použitím relatívneho zvýšenia počtu buniek (RICC) alebo relatívneho zdvojenia populácie (RPD) (pozri vzorce v dodatku 2), okrem prípadov, keď sa použije cytoB. Ak sa použije cytoB, možno stanoviť cytotoxicitu pomocou indexu replikácie (RI) (pozri vzorec v dodatku 2).
24. Ošetrovanie kultúr pomocou cytoB a meranie relatívnych frekvencií jednojadrových, dvojjadrových a viacjadrových buniek v kultúre predstavuje presnú metódu kvantifikácie účinku na proliferáciu buniek a cytotoxickej alebo cytostatickej aktivity ošetrovania (5) a zabezpečuje, že sú hodnotené len tie bunky, ktoré sa delili počas ošetrovania alebo po ňom.
25. V rámci štúdií využívajúcich cytoB možno kvantifikovať cytostázu/cytotoxicitu pomocou proliferačného indexu blokovania cytokinézy (CBPI) (5) (26) (56) alebo ich možno odvodiť pomocou indexu replikácie (RI) z minimálneho počtu 500 buniek na kultúru (pozri vzorec v dodatku 2). Ak sa cytoB použije na posúdenie proliferácie buniek, CBPI alebo RI by sa mali stanoviť z minimálneho počtu 500 buniek na kultúru. Tieto merania možno okrem iného použiť na odhadovanie cytotoxicity, a to porovnaním hodnôt ošetrovaných a kontrolných kultúr. Posúdenie iných markerov cytotoxicity (napr. zhluky, počet buniek, apoptóza, nekróza, počet metafáz) môže poskytnúť užitočné informácie.
26. V rámci štúdií, ktoré nevyužívajú cytoB, je potrebné preukázať, že bunky, ktoré sa v kultúre vyhodnocujú, prešli delením počas ošetrovania testovanou látkou alebo po ošetrovaní, v opačnom prípade môžu vzniknúť falošné negatívne odozvy. Metódy, ktoré sa využívajú na zabezpečenie toho, aby sa hodnotili delené bunky, zahŕňajú začlenenie a následnú detekciu brómdeoxyuridínu (BrdU) na identifikáciu replikovaných buniek (57), tvorbu klonov, keď sa bunky z permanentných bunkových línií ošetrili a vyhodnotili *in situ* na mikroskopickom sklíčku [proliferačný index (PI)] (25) (26) (27) (28), alebo meranie relatívneho zdvojenia populácie (RPD), relatívneho zvýšenia počtu buniek (RICC) alebo iné validované metódy (16) (56) (58) (59) (pozri vzorec v dodatku 2). Posúdenie iných markerov cytotoxicity alebo cytostázy (napr. zhluky, počet buniek, apoptóza, nekróza, počet metafáz) môže poskytnúť užitočné informácie.
27. Mali by sa hodnotiť minimálne tri analyzovateľné testovacie koncentrácie. Na tento účel bude možno potrebné vykonať pokus s použitím väčšieho počtu koncentrácií s tesným odstupom a analyzovať tvorbu mikrojadier v týchto koncentráciách, ktoré poskytujú vhodný rozsah cytotoxicity. Alternatívne možno vykonať predbežný test cytotoxicity s cieľom zúžiť rozsah pre konečné testovanie.
28. Najvyššia koncentrácia by mala vyvolať $55 \pm 5\%$ cytotoxicitu. Vyššie úrovne môžu ako vedľajší účinok cytotoxicity indukovať poškodenie chromozómov (60). Pri výskyte cytotoxicity by vybrané testované koncentrácie mali pokrývať rozsah od koncentrácie, ktorá vyvolá $55 \pm 5\%$ cytotoxicitu, až po koncentrácie, ktoré vyvolajú malú alebo žiadnu toxicitu.

29. Ak nie je pozorovaná žiadna cytotoxicita ani zrazenina, mala by sa najvyššia testovaná koncentrácia rovnať 0,01 M, 5 mg/mL alebo 5 µl/mL, podľa toho, ktorá je najnižšia. Medzi koncentraciami vybranými na analýzu by vo všeobecnosti mal byť odstup, ktorý nie je väčší ako 10. Pri testovaných látkach, ktoré sa vyznačujú strmou krivkou odozvy na koncentráciu, by odstup medzi koncentraciami testovaných látok mal byť menší, aby bolo možné hodnotiť aj kultúry s miernym a malým rozsahom toxicity.

30. Ak je obmedzujúcim faktorom rozpustnosť, mala by byť maximálnou koncentráciou – ak nie je obmedzená cytotoxicitou – najnižšia koncentrácia, pri ktorej je v kultúrach pozorovateľné minimálne zrážanie za predpokladu, že nenaruša hodnotenie. Hodnotenie zrážania by sa malo vykonávať pomocou metód, ako je napríklad svetelná mikroskopia, pričom sa zaznamenáva pretrvávajúca zrazenina alebo zrazenina, ktorá sa objaví počas kultivácie (na konci ošetrovania).

Kontroly

31. Každý pokus má obsahovať súbežné pozitívne kontroly a kontroly s rozpúšťadlom/nosičom s metabolickou aktiváciou i bez nej.

32. Pozitívne kontroly sú potrebné na preukázanie schopnosti použitých buniek a testovacieho protokolu identifikovať klastogény a aneugény a potvrdiť metabolickú schopnosť preparátu S9. Pozitívne kontroly by mali využívať známe látky, ktoré indukujú tvorbu mikrojádier pri koncentráciách, pri ktorých sa očakáva malý, ale reprodukovateľný nárast na pozadí, a ktoré preukážu citlivosť testovacieho systému. Koncentrácie pozitívnej kontroly by sa mali voliť tak, aby boli účinky jasné, ale aby pozorovateľovi neodhaľovali ihneď identitu kódovaných sklíčok.

33. Klastogén, ktorý si vyžaduje metabolickú aktiváciu (napríklad cyklofosfamid; benzo[a]pyrén), by sa mal použiť na preukázanie metabolickej schopnosti, ako aj schopnosti testovacieho systému detekovať klastogény. V prípade opodstatnenosti možno použiť aj iné pozitívne kontroly. Keďže niektoré pozitívne kontroly, ktoré si vyžadujú metabolickú aktiváciu, môžu byť za určitých podmienok ošetrovania alebo v určitých bunkových líniiach aktívne aj bez exogénnej metabolickej aktivácie, mala by sa otestovať potreba metabolickej aktivácie a aktivita preparátu S9 vo vybranej bunkovej línii a pri vybraných koncentráciách.

34. V súčasnosti nie sú známe žiadne aneugény, ktoré si vyžadujú metabolickú aktiváciu svojej genotoxikkej aktivity (16). Momentálne akceptované pozitívne kontroly pre aneugenickú aktivitu sú napríklad kolchicín a vinblastín. Iné chemikálie sa môžu použiť, ak indukujú tvorbu mikrojádier iba pomocou aneugenickkej aktivity alebo predovšetkým pomocou nej. Aby sa predišlo potrebe použiť dve pozitívne kontroly (pre klastogenicitu a aneugenicitu) bez metabolickej aktivácie, môže kontrola pre aneugenicitu slúžiť ako pozitívna kontrola bez S9 a kontrola pre klastogenicitu ako test primeranosti použitého systému metabolickej aktivácie. Pozitívna kontrola pre klastogenicitu, ako aj aneugenicitu by sa mala použiť pri tých bunkách, ktoré si nevyžadujú použitie S9. Navrhované pozitívne kontroly sú uvedené v dodatku 3.

35. Použitie pozitívnych kontrol týkajúcich sa chemických tried možno zvážiť, ak sú dostupné vhodné chemikálie. Všetky použité pozitívne kontroly by mali byť vhodné pre konkrétny bunkový typ a podmienky aktivácie.

36. Do každého odberu by sa mali zahrnúť kontroly s rozpúšťadlom/nosičom. Zároveň by sa mali použiť aj neošetrené negatívne kontroly (bez rozpúšťadla/nosiča) okrem prípadov, keď existujú zverejnené alebo laboratórne historické kontrolné údaje, ktoré potvrdzujú, že vybrané rozpúšťadlo pri použitej koncentrácii nemá genotoxické ani iné škodlivé účinky.

TESTOVACÍ POSTUP

Harmonogram ošetrovania

37. S cieľom maximalizovať pravdepodobnosť detekcie aktivity aneugénu alebo klastogénu účinkujúceho v konkrétnom štádiu bunkového cyklu je dôležité, aby počas všetkých štádií bunkového cyklu bol ošetrovaný dostatočný počet buniek testovanou látkou. Harmonogram ošetrovania bunkových línii a primárnych bunkových kultúr sa teda môže mierne odlišovať od harmonogramu ošetrovania lymfocytov, ktoré si vyžadujú mitogénnu stimuláciu na to, aby sa začal ich bunkový cyklus, a tieto sú uvedené v odsekoch 41 – 43 (16).

38. Teoretické úvahy, ako aj zverejnené údaje (18) naznačujú, že väčšinu aneugénov a klastogénov možno určiť na základe krátkodobého ošetrovania počas 3 až 6 hodín s použitím S9 a bez použitia S9, po ktorom nasleduje odobranie testovanej látky a rastové obdobie trvajúce 1,5 – 2,0-násobok bunkových cyklov (6). Z buniek sa odoberajú vzorky v čase približne 1,5 – 2,0-násobku dĺžky bežného (t. j. neošetreného) bunkového cyklu, a to na začiatku alebo na konci ošetrovania (pozri tabuľku 1). Čas odberu vzoriek alebo čas regenerácie možno predĺžiť, ak je známe alebo ak existuje podozrenie, že testovaná látka ovplyvňuje čas bunkového cyklu (napríklad pri testovaní nukleozidových analógov).

39. Kvôli možnej cytotoxicite preparátu S9 pre kultivované bunky cicavcov sa predĺžené expozičné ošetrenie počas 1,5 – 2,0-násobku bežného bunkového cyklu použije len bez S9. Pri predĺženom ošetrení možno ošetriť bunky testovanou chemikáliou s použitím alebo bez použitia cytoB. Tieto možnosti sa vzťahujú na situácie, pri ktorých môže existovať obava, že dôjde k možným interakciám medzi testovanou látkou a cytoB.
40. Navrhovaný harmonogram ošetrovania buniek je uvedený v tabuľke 1. Tento všeobecný harmonogram ošetrovania možno upraviť v závislosti od stability alebo reaktivity testovanej látky alebo od konkrétnych charakteristík rastu použitých buniek. Všetky ošetrenia by sa mali začať a ukončiť počas exponenciálneho rastu buniek. Harmonogram je detailnejšie opísaný v odsekoch 41 – 47.

Tabuľka 1

Čas ošetrovania a zberu buniek pri skúške MNvit

Lymfocyty, primárne bunky a bunkové línie ošetrené cytoB	+ S9	ošetrujte 3 – 6 hodín s použitím S9; odstráňte S9 a ošetrovacie médium; pridajte čerstvé médium a cytoB; bunky odoberte po 1,5 – 2,0-násobku bežného bunkového cyklu
	– S9 krátka expozícia	ošetrujte 3 – 6 hodín; odstráňte ošetrovacie médium; pridajte čerstvé médium a cytoB; bunky odoberte po 1,5 – 2,0-násobku bežného bunkového cyklu
	– S9 predĺžená expozícia	možnosť A: ošetrujte 1,5 – 2,0-násobok bežného bunkového cyklu s použitím cytoB; bunky odoberte na konci expozičného času; možnosť B: ošetrujte 1,5 – 2,0-násobok bežného bunkového cyklu; odstráňte testovanú látku; pridajte čerstvé médium a cytoB; bunky odoberte po 1,5 – 2,0-násobku bežného bunkového cyklu

Bunkové línie ošetrené bez cytoB

(Rovnaký postup ako pri harmonograme ošetrovania uvedenom vyššie s tou výnimkou, že sa nepridáva cytoB)

Lymfocyty, primárne bunky a bunkové línie s použitím cytoB

41. Najúčinnější prístup pri lymfocytoch je začať expozíciu testovanej látky 44 – 48 hodín po stimulácii PHA, keď sa synchronizácia cyklu stratí (5). V počiatočnej skúške sa bunky ošetrujú 3 až 6 hodín testovanou látkou bez S9 a s použitím S9. Ošetrovacie médium sa odstráni a nahradí čerstvým médiom, ktoré obsahuje cytoB, a bunky sa odoberú po 1,5 – 2-násobku bežného bunkového cyklu.
42. Ak sú obidva počiatočné testy krátkeho ošetrenia (3 – 6 hodín) negatívne alebo nejasné, v následnom predĺženom expozičnom ošetrení sa S9 nepoužije. K dispozícii sú dve možnosti ošetrenia a sú rovnako prijateľné. Môže byť však vhodnejšie postupovať pri stimulácii lymfocytov podľa možnosti A, kde sa exponenciálny rast môže 96 hodín po stimulácii znižovať. Okrem toho by kultúry buniek do finálneho odberu vzoriek v možnosti B nemali dosiahnuť zhluk.
- Možnosť A: Bunky sú ošetrované testovanou látkou počas 1,5 – 2,0-násobku bežného bunkového cyklu a odobrané na konci obdobia ošetrenia.
- Možnosť B: Bunky sú ošetrované testovanou látkou počas 1,5 – 2,0-násobku bežného bunkového cyklu. Ošetrovacie médium sa odstráni a nahradí čerstvým médiom a bunky sa odoberú po ďalšom 1,5 – 2-násobku bežného bunkového cyklu.
43. Primárne bunky a bunkové línie by sa mali ošetriť podobným spôsobom ako lymfocyty s výnimkou toho, že stimulácia PHA 44 – 48 hodín nie je potrebná. Iné bunky ako lymfocyty by mali byť vystavené tak, aby sa bunky v čase ukončenia štúdie stále nachádzali v log fáze rastu.

Bunkové línie bez cytoB

44. Bunky by sa mali ošetriť počas 3 – 6 hodín s použitím aj bez použitia S9. Ošetrovacie médium sa odstráni a nahradí čerstvým médiom a bunky sa odoberú po 1,5 – 2-násobku bežného bunkového cyklu.
45. Ak sú obidva počiatočné testy krátko ošetrenia (3 – 6 hodín) negatívne alebo nejasné, nasleduje predĺžené expozičné ošetrenie (bez S9). K dispozícii sú dve možnosti ošetrenia, z ktorých obidve sú rovnako prijateľné:
- Možnosť A: Bunky sú ošetrované testovanou látkou počas 1,5 – 2,0-násobku bežného bunkového cyklu a odobrané na konci obdobia ošetrenia.
 - Možnosť B: Bunky sú ošetrované testovanou látkou počas 1,5 – 2,0-násobku bežného bunkového cyklu. Ošetrovacie médium sa odstráni a nahradí čerstvým médiom a bunky sa odoberú po ďalšom 1,5 – 2-násobku bežného bunkového cyklu.
46. V monovrstvách môžu byť na konci 3 – 6-hodinového ošetrenia prítomné mitotické bunky (možno ich identifikovať ako okrúhle a oddeľujúce sa od povrchu). Keďže tieto mitotické bunky sa dajú jednoducho oddeliť, je možné, že sa pri odstraňovaní média obsahujúceho testovanú látku stratia. Preto ich pri umývaní kultúr treba opatrne odobrať a následne vrátiť ku kultúram s cieľom predísť strate buniek v mitóze a riziku pre mikrojadrá v čase zberu.

Počet kultúr

47. Duplicitné kultúry by sa mali použiť pre každú koncentráciu testovanej látky a pre kultúry s rozpúšťadlom/nosičom a kultúry na negatívnu kontrolu. Ak z historických laboratórnych údajov možno preukázať minimálnu variáciu medzi duplicitnými kultúrami, môže byť prijateľné použitie jednotlivých kultúr. Ak sú použité jednotlivé kultúry, odporúča sa, aby sa analyzoval zvýšený počet koncentrácií.

Odber buniek a príprava sklíčok

48. Každá kultúra sa odoberá a spracúva samostatne. Príprava buniek môže zahŕňať hypotonické ošetrenie, ale tento krok nie je potrebný, ak sa primerané šírenie buniek dosiahne iným spôsobom. Pri príprave sklíčok možno použiť rôzne techniky za predpokladu, že sa získajú vysokokvalitné bunkové preparáty. Cytoplazma bunky by sa mala zachovať, aby bola možná detekcia mikrojadier a (pri metóde blokovania cytokinézy) spoľahlivá identifikácia dvojjadrových buniek.
49. Sklíčka možno zafarbiť rôznymi metódami, napríklad farbivom Giemsa alebo fluorescenčným farbivom špecifickým pre DNA (59). Použitie špecifického farbiva DNA [napríklad akridínová oranžová (61) alebo Hoechst 33258 plus pyronín-Y (62)] môže eliminovať niektoré umelo vzniknuté štruktúry buniek spojené s používaním farbiva nešpecifického pre DNA. Protilátky kinetochoru, FISH (fluorescenčná hybridizácia *in situ*) s pan-centromerovými sondami DNA alebo značenie *in situ* pomocou primerov špecifických pre pancentroméru spolu s vhodným odfarbovacím roztokom DNA možno použiť na identifikáciu obsahov mikrojadier (chromozómy/ fragmenty chromozómov), ak sú predmetom záujmu mechanické informácie o ich tvorbe (15) (16). Na rozlíšovanie medzi klastogénmi a aneugénmi možno použiť aj iné metódy, ak sa ukázalo, že sú účinné.

Analýza

50. Všetky sklíčka vrátane sklíčok s rozpúšťadlom/nosičom a kontrolami by sa pred mikroskopickou analýzou mali nezávisle označiť kódmi. Prípadne sa kódované vzorky môžu analyzovať pomocou validovaného systému na automatickú tokovú cytometrickú alebo vizuálnu analýzu.
51. V kultúrach ošetrovaných cytoB by sa frekvencie mikrojadier mali analyzovať aspoň v 2 000 dvojjadrových bunkách na jednu koncentráciu (aspoň 1 000 dvojjadrových buniek na kultúru; dve kultúry na jednu koncentráciu). Ak sa použijú jednotlivé kultúry, malo by sa z jednej kultúry vyhodnotiť aspoň 2 000 dvojjadrových buniek na jednu koncentráciu. Ak je na hodnotenie k dispozícii podstatne menej ako 1 000 dvojjadrových buniek na kultúru alebo menej ako 2 000 dvojjadrových buniek, ak sa použije jediná kultúra a ak sa nezistí významné zvýšenie mikrojadier, test by sa mal zopakovať s použitím viacerých buniek alebo pri koncentráciách s menšou toxicitou, podľa toho, ktorá možnosť je vhodná. Malo by sa dbať na to, aby sa nezhodnotili dvojjadrové bunky nepravidelného tvaru ani bunky, ktorých jadrá sa výrazne odlišujú veľkosťou. Malo by sa dbať aj na to, aby nedošlo k zámene dvojjadrových buniek za mnohojadrové bunky, ktorých šírenie bolo nedostatočné. Bunky obsahujúce viac ako dve hlavné jadrá by sa nemali analyzovať na prítomnosť mikrojadier, keďže základná frekvencia mikrojadra môže byť v týchto bunkách vyššia (63) (64). Hodnotenie jednojadrových buniek je prijateľné v prípade, ak testovaná látka interferuje s aktivitou cytoB.

52. V bunkových líniiach analyzovaných bez ošetrovania cytoB by sa mikrojadrá mali hodnotiť aspoň v 2 000 bunkách na jednu koncentráciu (aspoň v 1 000 bunkách na kultúru, dve kultúry na jednu koncentráciu). Ak sa použije iba jedna kultúra na koncentráciu, malo by sa z nej vyhodnotiť aspoň 2 000 buniek.
53. Pri použití cytoB by sa mal určiť index CBPI alebo RI, aby sa posúdila proliferácia bunky (pozri dodatok 2) s použitím aspoň 500 buniek na kultúru. Pri ošetrovaní bez použitia cytoB je nevyhnutné poskytnúť dôkaz, že vyhodnocované bunky proliferovali, ako sa uvádza v odsekoch 24 – 27.

Kritériá prijateľnosti

54. Laboratórium, ktoré navrhuje použiť skúšku MNvit opísanú v tejto testovacej metóde, by malo preukázať svoju schopnosť spoľahlivo a presne zisťovať chemikálie so známou aneugénnou a klastogénnou aktivitou, či už s metabolickou aktiváciou, alebo bez nej, ako aj známe negatívne chemikálie pomocou referenčných chemikálií uvedených v dodatku 3. Ako dôkaz schopnosti správne vykonať túto testovaciu metódu by laboratórium malo poskytnúť dôkaz, že bunky, v ktorých sa hodnotí tvorba mikrojadra, ukončili jedno jadrové delenie, ak sa test vykonáva bez použitia cytoB.
55. Chemikálie uvedené v dodatku 3 sa odporúčajú na použitie ako referenčné chemikálie. Náhradné alebo doplnujúce chemikálie možno zahrnúť, ak je ich aktivita známa, ak vytvárajú mikrojadrá rovnakými mechanizmami pôsobenia a ak sa ukážu ako relevantné v porovnaní s chemikáliami, ktoré sa budú testovať postupom MNvit. Odôvodnenie by mohlo zahŕňať validačnú štúdiu, ktorá zapája veľké množstvo látok alebo sa sústreďuje na užšie spektrum založené na štúdiu chemickej triedy testovanej látky alebo mechanizmu poškodenia.
56. Kontrolné kultúry s rozpúšťadlom/nosičom a neošetrené kultúry by mali mať z hľadiska reprodukovateľnosti a konzistentnosti nízke frekvencie mikrojadier (zvyčajne 5 – 25 mikrojadier/1 000 buniek, ktoré patria do druhov buniek uvedených v odseku 11). Ostatné druhy buniek môžu mať rôzny rozsah odoziev, čo by sa malo určiť pri validácii ich vhodnosti na použitie v skúške MNvit. Údaje z negatívnej kontroly, kontroly s rozpúšťadlom a z pozitívnej kontroly by sa mali použiť na stanovenie historických kontrolných rozsahov. Tieto hodnoty by sa mali použiť pri rozhodovaní o primeranosti súbežnej pozitívnej/negatívnej kontroly v pokuse.
57. Ak sa navrhnu menšie zmeny protokolu skúšky (napr. použitie automatických namiesto manuálnych techník hodnotenia či použitie nového druhu bunky), je potrebné preukázať účinnosť zmeny skôr, ako takto upravený protokol možno považovať za prijateľný na použitie. Preukázanie účinnosti zahŕňa preukázanie schopnosti zisťovať hlavné mechanizmy chromozómového zlomu, nadbytku alebo straty a dosiahnuť vhodné pozitívne a negatívne výsledky pre triedu jednotlivých látok alebo pre celý rad látok, ktoré sa majú testovať.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

58. Ak sa použije metóda blokovania cytokinézy, pri hodnotení indukcie mikrojadier sa používajú iba frekvencie dvojjadrových buniek s mikrojadrami (bez ohľadu na počet mikrojadier v bunke). Hodnotenie počtu buniek s jedným mikrojadrom, s dvoma alebo viacerými mikrojadrami by mohlo poskytnúť užitočné informácie, ale nie je povinné.
59. Mali by sa určiť súbežné opatrenia v súvislosti s cytotoxicitou a/alebo cytostázou pre všetky ošetrené kultúry a kontrolné kultúry s rozpúšťadlom/nosičom (58). Pri všetkých ošetrených a kontrolných kultúrach by sa mali vypočítavať indexy CBPI alebo RI, ktoré merajú oneskorenie bunkového cyklu pri použití metódy blokovania cytokinézy. V prípade, že sa nepoužíva cytoB, mali by sa použiť RDP alebo RICC, alebo index PI (pozri dodatok 2).
60. Mali by sa uvádzať údaje o jednotlivých kultúrach. Okrem toho by sa všetky údaje mali uvádzať v tabuľkovej podobe.
61. Chemikálie, ktoré indukujú mikrojadrá v skúške MNvit, tak môžu urobiť, pretože indukujú chromozómový zlom, stratu chromozómu alebo ich kombináciu. Ďalšiu analýzu, ktorá využíva protilátky kinetochoru, sondy *in situ* špecifické pre centroméry alebo iné metódy, možno použiť na určenie toho, či mechanizmus indukcie mikrojadra je následkom klastogénnej a/alebo aneugénnej aktivity.

Vyhodnocovanie a interpretácia výsledkov

62. Neexistuje požiadavka na overenie jasnej pozitívnej alebo negatívnej odozvy ďalším testovaním. Nejasné výsledky možno objasniť analýzou ďalších 1 000 buniek zo všetkých kultúr s cieľom zabrániť strate slepých testov. Ak sa týmto prístupom výsledok neobjasní, treba vykonať ďalšie testy. Modifikácia parametrov štúdie z dôvodu rozšírenia alebo zúženia rozsahu podmienok by sa mala zvážiť pri následných pokusoch, ak je to vhodné. Parametre štúdie, ktoré by sa mohli modifikovať, zahŕňajú odstup medzi testovanými koncentraciami, načasovanie ošetrovania a zber buniek a/alebo podmienky metabolickej aktivity.

63. Na stanovenie pozitívneho výsledku existuje niekoľko kritérií, ako napríklad nárast súvisiaci s koncentráciou alebo štatisticky významné zvýšenie počtu buniek obsahujúcich mikrojadrá. Najskôr sa zvažuje biologická relevantnosť výsledkov. Zváženie toho, či pozorované hodnoty sú v rozsahu historickej kontroly alebo mimo neho, môže poskytnúť usmernenie pri hodnotení biologického významu odozvy. Ako pomôcky pri hodnotení výsledkov testov možno používať primerané štatistické metódy (65). Výsledky štatistických testov by sa však mali hodnotiť vzhľadom na vzťah medzi dávkou a odozvou. Mala by sa zohľadniť aj reprodukovateľnosť a historické údaje.
64. Hoci väčšina pokusov poskytne jasne pozitívne alebo negatívne výsledky, v niektorých prípadoch súbor údajov vopred vylúči jednoznačné posúdenie aktivity testovanej látky. Tieto nejasné alebo spochybňiteľné odozvy môžu nastať bez ohľadu na počet opakovaní pokusu.
65. Pozitívne výsledky skúšky MNvit naznačujú, že testovaná látka vyvoláva chromozómový zlom alebo stratu chromozómu v kultivovaných bunkách cicavcov. Negatívne výsledky naznačujú, že testovaná látka nevyvoláva v testovacích podmienkach chromozómové zlomy a/ani ich nadbytok či stratu v kultivovaných bunkách cicavcov.

Správa o teste

66. Správa o teste by mala obsahovať aspoň tieto informácie, ak sú relevantné pre uskutočnenie štúdie:

Testovaná chemikália:

- identifikačné údaje a registračné číslo CAS (Chemical Abstract Services) a číslo EC,
- fyzikálna povaha a čistota,
- fyzikálno-chemické vlastnosti relevantné pre uskutočnenie štúdie,
- reaktivita testovanej chemikálie v kultivačnom médiu s rozpúšťadlom/nosičom alebo v bunkovom kultivačnom médiu.

Rozpúšťadlo/nosič:

- zdôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča,
- rozpustnosť a stabilita testovanej látky v rozpúšťadle/nosiči.

Bunky:

- typ a zdroj použitých buniek,
- vhodnosť použitého typu bunky,
- neprítomnosť mykoplazmy, ak je to vhodné,
- informácie o dĺžke bunkového cyklu, násobení času alebo proliferačnom indexe,
- pri použití lymfocytov pohlavie, vek a počet darcov krvi, ak je to vhodné,
- pri použití lymfocytov informácia o tom, či je vystavená celá krv, alebo oddelené lymfocyty,
- počet prechodov, ak je to vhodné,
- metódy udržiavania bunkových kultúr, ak je to vhodné,
- modálny počet chromozómov,
- trvanie bežného bunkového cyklu (negatívna kontrola).

Podmienky testovania:

- identita látky blokujúcej cytokinézu (napr. cytoB), ak je použitá, jej koncentrácia a trvanie expozície bunky,
- zdôvodnenie výberu koncentrácií a počtu kultúr vrátane údajov o cytotoxicite a obmedzeniach rozpustnosti, ak sú dostupné,

- skladba média, koncentrácia CO₂, ak je to vhodné,
- koncentrácie testovanej látky,
- koncentrácia (a/alebo objem) nosiča a pridanej testovanej látky,
- inkubačná teplota a inkubačná doba,
- trvanie ošetrovania,
- čas zberu po ošetrení,
- hustota buniek pri zapustení, ak je to vhodné,
- typ a zloženie systému metabolickej aktivácie vrátane kritérií prijateľnosti,
- chemikálie na pozitívne kontroly a negatívne kontroly,
- použité metódy prípravy sklíčok a metóda farbenia,
- kritériá na identifikáciu mikrojadier,
- počet analyzovaných buniek,
- metódy merania cytotoxicity,
- všetky doplňujúce informácie týkajúce sa cytotoxicity,
- kritériá hodnotenia štúdií ako pozitívnych, negatívnych alebo nejasných,
- metóda(-y) použitej štatistickej analýzy,
- metódy, ako napríklad použitie protilátky kinetochoru s cieľom charakterizovať, či mikrojadrá obsahujú celé chromozómy, alebo fragmenty chromozómov, ak je to vhodné.

Výsledky:

- meranie použitej cytotoxicity, napr. CBPI alebo RI, v prípade použitia metódy blokovania cytokinézy, RICC, RPD alebo PI, keď sa metódy blokovania cytokinézy nepoužívajú, ďalšie pozorovania, ak je to vhodné, napr. zhluk buniek, apoptóza, nekróza, počítanie metafáz, frekvencia dvojjadrových buniek,
- príznaky zrážania,
- údaje o hodnotách pH a osmolality ošetrovacieho média, ak sú stanovené,
- definovanie buniek prijateľných na analýzu,
- distribúcia jednojadrových, dvojjadrových a viacjadrových buniek pri použití metódy blokovania cytokinézy,
- počet buniek s mikrojadrami uvedený oddelene pre každú ošetrovanú a kontrolnú kultúru a stanovenie, či pochádzajú z dvojjadrových, alebo jednojadrových buniek, ak je to potrebné,
- vzťah medzi koncentráciou a odozvou, ak ho možno určiť,
- údaje o chemikáliách na súbežné negatívne (rozpušťaadlo/nosič) a pozitívne kontroly (koncentrácie a rozpušťač),
- historické údaje o chemikáliách na negatívne (rozpušťaadlo/nosič) a pozitívne kontroly obsahujúce rozsahy, stredné hodnoty a štandardnú odchýlku a stupeň spoľahlivosti (napr. 95 %),
- štatistická analýza, p-hodnoty, ak existujú.

Rozbor výsledkov

Záver

LITERATÚRA

1. Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.*, 392, 1 – 4.
2. Parry, J. M. and Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, *Mutation Res.*, 287, 3 – 15.
3. Fenech, M. and Morley, A. A. (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios.*, 43, 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. and Wakata, A. (2000), Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 167 – 172.
5. Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols*, 2(5), 1084 – 1104.
6. Fenech, M. and Morley, A. A. (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Res.*, 161, 193 – 198.
7. Eastmond, D. A. and Tucker, J. D. (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 34 – 43.
8. Eastmond, D. A. and 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, 9 – 20.
9. Miller, B. M., Zitzelsberger, H. F., Weier, H. U. and 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, *Mutagenesi.*, 6, 297 – 302.
10. Farooqi, Z., Darroudi, F. and Natarajan, A. T. (1993), The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesi.*, 8, 329 – 334.
11. Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. and 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, 205 – 213.
12. Norppa, H., Renzi, L. and Lindholm, C. (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization, *Mutagenesi.*, 8, 519 – 525.
13. Eastmond, D. A., Rupa, D. S. and 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, 9 – 20.
14. Marshall, R. R., Murphy, M., Kirkland, D. J. and Bentley, K. S. (1996), Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Res.*, 372, 233 – 245.
15. Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. and Crebelli, R. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Res.*, 372, 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. and Wakata, A. (2003), Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.*, 540, 153 – 163.
17. OECD (1997), *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Tes.*, Test Guideline No 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [www.oecd.org/env/testguidelines].

18. Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M. J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon, G. and Marzin, D. (2006), SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, *Mutation Res.*, 607, 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. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes, *Mutation Res.*, 607, 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. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells, *Mutation Res.*, 607, 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. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, *Mutation Res.*, 607, 88 – 124.
22. Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells, *Mutation Res.*, 607, 125 – 152.
23. Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A. A. and Locher, F. (1997), Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 187 – 208.
24. Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. and Lorge, E. (1997), Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 45 – 59.
25. Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. and 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, 81 – 116.
26. Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. and Madle, S. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches, *Mutation Res.* 439, 183 – 190.
27. Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S. Y., Kasper, P. and Müller, L. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutation Res.* 445, 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., Gortitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. and 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, 137 – 163.
29. Garriott, M. L., Phelps, J. B. and 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, 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. and Sofuni, T. (1999), Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesi.*, 14, 569 – 580.
31. Elhajouji, A., and Lorge, E. (2006), Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 607, 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. 25. stretnutie ESAC, 16. a 17. novembra 2006. K dispozícii na stránke: [<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. K dispozícii na stránke: [<http://ecvam.jrc.it/index.htm>].

34. Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S., van Benthem, J., Vanparys P. (2008), ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT), *Mutagenesi.*, 23, 271 – 283.
35. Zhang, L. S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. and 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, 105 – 115.
36. Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. and Knasmeuller, S. (2002), Fumonisin B₁ is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, *Mutagenesi.*, 17, 257 – 260.
37. Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W. W., Hoelzl, C., Bichler, J. and Majer, B. J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge, *Toxicol.*, 198, 315 – 328.
38. Gibson, D. P., Brauningner, R., Shaffi, H. S., Kerckaert, G. A., LeBoeuf, R. A., Isfort, R. J. and 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, 61 – 70.
39. Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and 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, 147 – 205.
40. Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 268, 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, 789 – 886.
42. Fenech, M. and Morley, A. A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Res.*, 147, 29 – 36.
43. Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, *Mutation Res.*, 392, 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. and 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, 31 – 45.
45. Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173 – 215.
46. Ong, T.-M., Mukhtar, M., Wolf, C. R. and 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, 55 – 65.
47. Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, 7, 175 – 177.
48. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, In: de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds), *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, s. 85 – 88.
49. Johnson, T. E., Umbenhauer, D. R. and Galloway, S. M. (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51 – 59.
50. UNEP (2001), Štokholmský dohovor o perzistentných organických látkach, Program OSN pre životné prostredie (UNEP). K dispozícii na stránke: [<http://www.pops.int/>].

51. Doherty, A. T., Ellard, S., Parry, E. M. and Parry, J. M. (1996), An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, *Mutagenesi.*, 11, 247 – 274.
52. Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, *In*: Tice, R. R., Costa, D. L. and Schaich, K. M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, s. 91 – 103.
53. Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay, *Environ. Mutagenesis* 5, 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, 35 – 44.
55. Phelps, J. B., Garriott, M. L., and 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, 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., Surralles, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A. (2004), Corrigendum to 'Report from the *in vitro* micronucleus assay working group', *Mutation Res.*, 564, 97 – 100.
57. Pincu, M., Bass, D. and Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.*, 139, 61 – 65.
58. Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. and 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, 1 – 3.
59. Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. and Marcos, R. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 341, 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, 191 – 201.
61. Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, 241 – 247.
62. MacGregor, J. T., Wehr, C. M., and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, 269 – 275.
63. Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.*, 120, 241 – 247.
64. Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and 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, 65 – 75.
65. Hoffman, W. P., Garriott, M. L. and Lee, C. (2003), *In vitro* micronucleus test, *In*: *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, s. 463 – 467.
66. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 850/2004 z 29. apríla 2004 o perzistentných organických znečisťujúcich látkach, ktorým sa mení a dopĺňa smernica 79/117/EHS (Ú. v. EÚ L 229, 30.4.2004, s. 5).

Dodatok 1

Vymedzenie pojmov

Aneugén: každá látka alebo proces, ktorý vzájomne pôsobí so zložkami cyklu mitotického a meiotického delenia buniek, a tým vedie k aneuploidii v bunkách alebo organizmoch.

Aneuploidia: akákoľvek odchýlka od bežného diploidného (alebo haploidného) počtu chromozómov vo forme jedného alebo viacerých chromozómov, ktoré netvoria celý(-é) súbor(-y) chromozómov (polyploidia).

Apoptóza: programovaná bunková smrť charakterizovaná sériou krokov, ktoré vedú k rozpadu buniek na častice spojené membránou, ktoré sú následne pohltené fagocytózou alebo uvoľnené.

Prolifерácia buniek: zvýšenie počtu buniek v dôsledku mitotického delenia bunky.

Centroméra: oblasť chromozómu DNA, kde sa spájajú obe chromatídy a kde sú vedľa seba viazané oba kinetochory.

Klastogén: akákoľvek látka alebo proces, ktoré spôsobujú štrukturálne chromozómové odchýlky v populáciách buniek alebo organizmov.

Cytokinéza: proces delenia bunky, ktorý nasleduje ihneď po mitóze a v ktorom vznikajú dve dcérske bunky – každá s jedným jadrom.

Proliferačný index blokovania cytokinézy (CBPI): pomer druhého delenia buniek v ošetrenej populácii vo vzťahu k neošetrenej kontrole (pozri vzorec v dodatku 2).

Cytostáza: inhibícia rastu buniek (pozri vzorec v dodatku 2).

Cytotoxicita: škodlivé účinky na štruktúru alebo funkciu bunky, ktoré postupne spôsobia jej smrť.

Genotoxický: všeobecný výraz, ktorý zahŕňa všetky typy poškodenia DNA alebo chromozómov vrátane zlomov, aduktov, zmien usporiadania, mutácií, chromozómových odchýlok a aneuploidie. Nie všetky typy genotoxických účinkov majú za následok mutácie alebo trvalé poškodenie chromozómu.

Bunky v interfáze: bunky, ktoré nie sú v štádiu mitotického delenia.

Kinetochor: štruktúra obsahujúca bielkoviny, ktorá sa zhromažďuje na centromére chromozómu, na ktorú sa počas delenia buniek viažu vlákna deliaceho vretienka umožňujúce riadny pohyb dcérskych chromozómov k pólom dcérskych buniek.

Mikrojadrá: samostatné malé jadrá dopĺňujúce hlavné jadrá buniek, ktoré sa vytvárajú počas telofázy mitózy alebo meiózy zo zaostávajúcích chromozómových fragmentov alebo celých chromozómov.

Mitóza: rozdelenie bunkového jadra, ktoré sa zvyčajne delí na profázu, prometafázu, metafázu, anafázu a telofázu.

Mitotický index: pomer buniek v metafáze delený celkovým počtom buniek pozorovaných v populácii buniek; náznak stupňa proliferácie buniek tejto populácie.

Mutagénny: produkujúci dedičnú zmenu série(-í) básových párov DNA v génoch alebo štruktúry chromozómov (chromozómové odchýlky).

Nerozpojenie: chyba pri rozdeľovaní spárovaných chromatíd, ktorá spôsobí, že vznikajúce dcérske bunky sa riadne neoddelia, následkom čoho vznikajú dcérske bunky s abnormálnym počtom chromozómov.

Polyploidia: početné chromozómové odchýlky v bunkách alebo organizmoch, ktoré zahŕňajú celý(-é) súbor(-y) chromozómov na rozdiel od jednotlivého chromozómu alebo chromozómov (aneuploidia).

Proliferačný index (PI): metóda merania cytotoxicity, pri ktorej sa nepoužíva cytoB (pozri vzorec v dodatku 2).

Relatívne zvýšenie počtu buniek (RICC): metóda merania cytotoxicity, pri ktorej sa nepoužíva cytoB (pozri vzorec v dodatku 2).

Relatívne zdvojenie populácie (RPD): metóda merania cytotoxicity, pri ktorej sa nepoužíva cytoB (pozri vzorec v dodatku 2).

Index replikácie (RI): pomer cyklov delenia buniek, ktoré boli dokončené v ošetrenej kultúre, vo vzťahu k neošetrenej kontrole počas obdobia expozície a regenerácie (pozri vzorec v dodatku 2).

Testovaná chemikália (tiež sa nazýva testovaná látka): Akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Dodatok 2

Vzorce na hodnotenie cytotoxicity

1. Pri použití cytoB by hodnotenie cytotoxicity malo byť založené na proliferačnom indexe blokovania cytokinézy (CBPI) alebo na indexe replikácie (RI) (16) (58). CBPI naznačuje priemerný počet bunkových cyklov na bunku počas obdobia expozície cytoB a môže sa použiť na výpočet proliferácie buniek. RI indikuje relatívny počet jadier v ošetrovaných kultúrach v porovnaní s kontrolnými kultúrami a možno ho použiť na percentuálny výpočet cytostázy:

$$\text{Cytostáza \%} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

pričom:

T = kultúra ošetrovaná testovanou chemikáliou

C = kontrolná kultúra s nosičom,

kde:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{počet jednojadrových buniek}) + (2 \times \text{počet dvojjadrových buniek}) + (3 \times \text{počet viacjadrových buniek}))}{(\text{celkový počet buniek})}$$

Preto ak CBPI je 1 (všetky bunky sú jednojadrové), rovná sa 100 % cytostáze.

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

$$\text{RI} = \frac{((\text{počet dvojjadrových buniek}) + (2 \times \text{počet viacjadrových buniek})) \div (\text{celkový počet buniek})_T}{((\text{počet dvojjadrových buniek}) + (2 \times \text{počet viacjadrových buniek})) \div (\text{celkový počet buniek})_C} \times 100$$

T = ošetrované kultúry

C = kontrolné kultúry.

2. Preto ak RI je 53 %, znamená to, že v porovnaní s počtom buniek, ktorých delením vznikli dvojjadrové a viacjadrové bunky v kontrolnej kultúre, len 53 % tohto počtu sa delilo v ošetrovanej kultúre, t. j. cytostáza je 47 %.

3. Bez použitia cytoB sa odporúča hodnotenie cytotoxicity založené na relatívnom zvýšení počtu buniek (RICC) alebo na relatívnom zdvojení populácie (RPD) (58), pretože v oboch prípadoch sa zohľadňuje pomer populácie delených buniek.

$$\text{RICC} = \frac{(\text{zvýšenie počtu buniek v ošetrovaných kultúrach (konečné - počiatočné)})}{(\text{zvýšenie počtu buniek v kontrolných kultúrach (konečné - počiatočné)})} \times 100$$

$$\text{RPD} = \frac{(\text{počet zdvojených populácií v ošetrovaných kultúrach})}{(\text{počet zdvojených populácií v kontrolných kultúrach})} \times 100$$

kde:

$$\text{Zdvojenie populácie} = [\log (\text{počet buniek po ošetrovaní} \div \text{počiatočný počet buniek})] \div \log 2.$$

4. Preto 53 % RICC alebo RPD indikuje 47 % cytotoxicitu/cytostázu.

5. Pri použití indexu proliferácie (PI) môže byť cytotoxicita hodnotená pomocou počítania počtu klonov obsahujúcich jednu bunku (cl1), 2 bunky (cl2), 3 až 4 bunky (cl4) a 5 až 8 buniek (cl8)

$$\text{PI} = \frac{((1 \times \text{cl1}) + (2 \times \text{cl2}) + (3 \times \text{cl4}) + (4 \times \text{cl8}))}{(\text{cl1} + \text{cl2} + \text{cl4} + \text{cl8})}$$

6. PI sa používa ako hodnotný a spoľahlivý parameter cytotoxicity aj pri bunkových líniiach kultivovaných *in situ* bez použitia cytoB (25) (26) (27) (28).

Dodatok 3

Referenčné chemikálie odporúčané na hodnotenie výkonnosti ⁽¹⁾

Kategória	Chemikália	Číslo CAS	Číslo EC
1. Klastogény aktívne bez metabolickej aktivity			
	cytozín arabinosid	147-94-4	205-705-9
	mitomycín C	50-07-7	200-008-6
2. Klastogény vyžadujúce metabolickú aktiváciu			
	benzo(a)pyrén	50-32-8	200-028-5
	cyklofosamid	50-18-0	200-015-4
3. Aneugény			
	kolchicín	64-86-8	200-598-5
	vinblastín	143-67-9	205-606-0
4. Negatívne látky			
	di(2-etylhexyl)ftalát	117-81-7	204-211-0
	kyselina nalidixová	389-08-2	206-864-7
	pyrén	129-00-0	204-927-3
	chlorid sodný	7647-14-5	231-598-3

⁽¹⁾ Referenčné chemikálie sú odporúčané chemikálie na použitie. Nahradíť alebo doplniť chemikálie do zoznamu referenčných chemikálií možno v prípade, ak je ich aktivita známa, ak indukujú mikrojadrá rovnakými mechanizmami pôsobenia a ak sa ukázu ako relevantné v porovnaní s chemikáliami, ktoré sa budú testovať postupom MNvit. Odôvodnenie by v závislosti od účelu mohlo zahŕňať validačnú štúdiu, ktorá zapája veľké množstvo látok alebo sa sústreďuje na užšie spektrum založené na štúdiu chemickej triedy testovanej látky alebo mechanizmu poškodenia.

B. 50. SENZIBILIZÁCIA KOŽE: LOKÁLNA SKÚŠKA LYMFATICKÝCH UZLÍN: DA

ÚVOD

- Usmernenia Organizácie pre hospodársku spoluprácu a rozvoj (OECD) na testovanie chemikálií a testovacie metódy EÚ sa pravidelne revidujú vzhľadom na vedecký pokrok, zmeny regulačných potrieb a dobré životné podmienky zvierat. Prvá testovacia metóda (TM) (B.42) na stanovenie senzibilizácie kože u myší, tzv. lokálna skúška lymfatických uzlín (LLNA; usmernenie OECD na vykonávanie testov 429), bola zrevidovaná (1). Podrobnosti validácie LLNA a revízia prác v tejto oblasti boli uverejnené (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Pri LLNA sa na meranie proliferácie lymfocytov používa rádioizotopický tymidín alebo jóid, a preto má táto skúška obmedzené použitie v tých prípadoch, kde je problematické získavanie, použitie alebo likvidácia rádioaktívnych látok. LLNA: DA (vyvinutá spoločnosťou Daicel Chemical Industries, Ltd.) je nerádioaktívnou modifikáciou LLNA, ktorá kvantifikuje obsah adenosín-trifosfátu (ATP) prostredníctvom bioluminiscencie, ktorá je ukazovateľom proliferácie lymfocytov. LLNA: Testovacia metóda DA bola validovaná a zrevidovaná a odporúča ju medzinárodný panel pre partnerské preskúvanie ako užitočnú metódu na identifikáciu chemikálií spôsobujúcich alebo nespôsobujúcich senzibilizáciu kože s určitými obmedzeniami (10) (11) (12) (13). Táto testovacia metóda je vytvorená na posúdenie potenciálu chemikálií (látok a zmesí) spôsobiť senzibilizáciu kože u zvierat. Metóda opísaná v kapitole B.6 tejto prílohy a usmernení OECD na vykonávanie testov 406 využíva testy s morčatami, konkrétne maximalizačný test morčiat a Buehlerov test (14). LLNA (kapitola B.42 tejto prílohy; usmernenie OECD na vykonávanie testov 429) a dve nerádioaktívne modifikácie LLNA: DA (kapitola B.50 tejto prílohy; usmernenie OECD na vykonávanie testov 442 A) a LLNA: BrdU-ELISA (kapitola B.51 tejto prílohy; usmernenie OECD na vykonávanie testov 442 B) poskytujú výhodu v porovnaní s testami na morčatách opísanými v kapitole B.6 a usmernení OECD na vykonávanie testov 406 (14), a to pokiaľ ide o obmedzenie a zdokonalenie využívania zvierat.
- Podobne ako LLNA, LLNA: DA skúma indukčnú fázu senzibilizácie kože a poskytuje kvantitatívne údaje vhodné na posúdenie odozvy na dávku. Okrem toho schopnosť identifikovať látky spôsobujúce senzibilizáciu kože bez potreby používania rádioaktívneho značenia DNA znižuje potenciál expozície rádioaktivity pri práci a problémy v súvislosti s likvidáciou odpadu. To môže následne umožniť zvýšené využívanie myší na identifikáciu látok spôsobujúcich senzibilizáciu kože, čo by ďalej mohlo znížiť využívanie morčiat na testovanie potenciálu senzibilizácie kože (t. j. B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (14).

VYMEDZENIE POJMOV

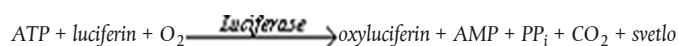
- Použité definície sú uvedené v dodatku 1.

ÚVODNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

4. LLNA: DA je upravenou metódou LLNA na identifikáciu potenciálu chemikálií spôsobiť senzibilizáciu kože, ktorá má určité obmedzenia. Neznamená to nevyhnutne, že vo všetkých prípadoch sa má použiť LLNA: DA namiesto testu LLNA alebo testov s morčatami (t. j. metóda B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (14), ale skôr to, že táto skúška je rovnako hodnotná a môže sa použiť ako alternatíva, v ktorej pozitívne a negatívne výsledky vo všeobecnosti nevyžadujú ďalšie potvrdenie (10) (11). Testovacie laboratórium by malo posúdiť všetky dostupné informácie o testovanej látke pred uskutočnením štúdie. Takéto informácie budú obsahovať identitu a chemickú štruktúru testovanej látky, jej fyzikálno-chemické vlastnosti, výsledky všetkých ostatných *in vitro* alebo *in vivo* testov toxicity s testovanou látkou a toxikologické údaje o štruktúrne príbuzných chemikáliách. Tieto informácie treba vziať do úvahy pri určovaní, či LLNA: DA je pre testovanú látku vhodná [vzhľadom na nezlúčiteľnosť obmedzených druhov chemikálií s LLNA: DA (pozri odsek 5)], a ako pomoc pri výbere dávok.
5. LLNA: DA je metóda *in vivo*, a to znamená, že pri hodnotení aktivity alergickej kontaktnej senzibilizácie sa nevylučuje používanie zvierat. Má však potenciál obmedziť používanie zvierat na tento účel pri porovnaní s testami na morčatách (B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (14). Okrem toho LLNA: DA ponúka značné zjemnenie spôsobu, akým sa zvieratá používajú na testy alergickej kontaktnej senzibilizácie (znižuje bolesť a utrpenie zvierat), keďže na rozdiel od metódy B.6 a usmernenia OECD na vykonávanie testov 406 LLNA: DA nevyžaduje, aby sa vyvolali reakcie dermálnej hypersenzitivity. Napriek výhodám, ktoré má LLNA: DA v porovnaní s metódou B.6 a usmernením OECD na vykonávanie testov 406 (14), existujú určité obmedzenia, ktoré by si mohli vyžadovať použitie metódy B.6 alebo usmernenie OECD na vykonávanie testov 406 [napr. testovanie určitých kovov, falošné pozitívne zistenia s určitými kožnými dráždivými látkami (ako napríklad niektoré povrchovo aktívne látky) (6) (1 a kapitola B.42 tejto prílohy), rozpustnosť testovanej látky]. Okrem toho chemické triedy alebo látky, ktoré obsahujú potenciálne zmätočné funkčné skupiny (16), si tiež môžu vyžadovať použitie testov s morčatami [t. j. B.6, usmernenie OECD na vykonávanie testov 406 (14)]. Obmedzenia, ktoré boli identifikované pre LLNA (1 a kapitola B.42 tejto prílohy), sa odporúčajú aj pre LLNA: DA (10). Okrem toho použitie LLNA: DA nemusí byť vhodné na testovanie látok, ktoré ovplyvňujú úroveň ATP (napr. látky, ktoré fungujú ako inhibítory ATP), alebo látok, ktoré ovplyvňujú presné meranie vnútrobunkového ATP (napr. prítomnosť enzýmov spôsobujúcich degradáciu ATP, prítomnosť ATP v mimobunkovom priestore lymfatickej uzliny). Okrem takto identifikovaných obmedzení by sa LLNA: DA mala uplatňovať pri testovaní všetkých látok okrem prípadov, keď tieto látky majú vlastnosti, ktoré by mohli narušovať presnosť LLNA: DA. Okrem toho by sa mala zvážiť možnosť hraničných pozitívnych výsledkov v prípade, keď sa dosiahnu hodnoty stimulačného indexu (SI) od 1,8 do 2,5 (pozri odseky 31 a 32). To je založené na validačnej databáze 44 látok s použitím $SI \geq 1,8$ (pozri odsek 6), pre ktoré LLNA: DA správne identifikovala 32 látok spôsobujúcich senzibilizáciu podľa LLNA, ale nesprávne identifikovala tri z 12 látok nespôsobujúcich senzibilizáciu podľa LLNA s hodnotami SI od 1,8 do 2,5 (t. j. hraničný pozitívny výsledok) (10). Keďže sa však na stanovenie hodnôt SI a výpočet predpokladaných vlastností testu použil rovnaký súbor údajov, stanovené údaje môžu byť nadhodnotením skutočných prediktívnych vlastností.

PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

6. Základným princípom, na ktorom sa LLNA: DA zakladá, je, že senzibilizátory vyvolávajú proliferáciu lymfocytov v lymfatickej uzline v drénovanom mieste aplikácie testovanej látky. Táto proliferácia je úmerná dávke a účinnosti aplikovaného alergénu a poskytuje jednoduchý prostriedok na získanie kvantitatívneho merania senzibilizácie. Proliferácia sa meria porovnávaním priemeru proliferácie v každej pokusnej skupine s priemerom proliferácie v kontrolnej skupine, ktorej sa podáva nosič (VC). Určí sa pomer priemernej proliferácie v každej ošetrenej skupine a priemernej proliferácie v súbežnej kontrolnej skupine s nosičom, ktorý sa označuje ako stimulačný index (SI) a mal by mať hodnotu $\geq 1,8$ pred ďalším prípadným vyhodnotením testovanej látky ako potenciálneho senzibilizátora kože. Uvedené metódy sú založené na meraní obsahu ATP pomocou bioluminiscencie (ktoré koreluje s počtom živých buniek) (17) na preukázanie proliferácie zvýšeného počtu buniek v drénovaných ušných lymfatických uzlinách (18) (19). Metóda bioluminiscencie využíva enzým luciferáza na katalýzu tvorby svetla z ATP a luciferínu podľa tejto reakcie:



Intenzita vyžarovaného svetla priamo súvisí s koncentráciou ATP a meria sa pomocou luminometra. Skúška luciferínu – luciferázy je citlivá metóda kvantifikácie ATP, ktorá sa používa v mnohých rôznych aplikáciách (20).

OPIS SKÚŠKY

Výber druhov zvierat

7. Vybraným druhom pre tento test je myš. Validačné štúdie LLNA: DA sa vykonávali výlučne s myšami kmeňa CBA/J, ktorý sa preto považuje za preferovaný kmeň (12) (13). Použijú sa mladé dospelé negravídne samice myši, ktoré nikdy nevrhli mláďatá. Na začiatku štúdie by zvieratá mali byť vo veku 8 – 12 týždňov a rozdiel medzi hmotnosťami zvierat má byť minimálny a nemá byť vyšší ako 20 % priemernej hmotnosti. Alternatívne sa môžu použiť iné kmene a samce, ak sa na základe údajov dá uspokojivo dokázať, že neexistujú významné odlišnosti špecifické pre kmeň a/alebo pohlavie v odozve na LLNA: DA.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

8. Myši by sa mali umiestniť v skupinách (21), pokiaľ sa neposkytne primerané vedecké odôvodnenie ich umiestnenia jednotlivu. Teplota miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť $22 \pm 3^\circ\text{C}$. Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 % a pokiaľ možno by nemala prevyšovať 70 % okrem obdobia počas čistenia miestnosti, cieľom je, aby relatívna vlhkosť dosahovala 50 % – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody.

Príprava zvierat

9. Zvieratá sa vyberú náhodne a sú označené tak, aby sa umožnila jednotlivá identifikácia (ale nie formou ušných značiek), a držia sa v kliečkach aspoň 5 dní pred začiatkom podávania dávok, aby sa aklimatizovali na laboratórne podmienky. Pred začatím ošetrovania sa všetky zvieratá vyšetrí, aby sa zaistilo, že nemajú žiadne viditeľné kožné poranenia.

Príprava dávok

10. Chemikálie v tuhom skupenstve by sa pred podaním dávky do ucha myši mali rozpustiť alebo suspendovať v rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je to vhodné, rozriediť. Kvapalné chemikálie možno podávať priamo alebo pred podaním rozriediť. V prípade nerozpustných chemikálií, ako napríklad tých, ktoré sa vo všeobecnosti používajú ako zdravotnícke pomôcky, by sa pred podaním dávky do ucha myši mala uskutočniť zvýšená extrakcia vo vhodnom rozpúšťadle, aby sa odhalili všetky extrahovateľné zložky, ktoré sa budú testovať. Testované látky sa pripravujú každý deň okrem prípadu, keď údaje o stabilite preukazujú prijateľnosť uskladnenia.

Kontrola spoľahlivosti

11. Riadne vykonanie skúšky sa dokazuje pomocou chemikálií na pozitívne kontroly (PC), ktoré reagujú primeranou a reprodukovateľnou citlivosťou na senzibilizujúcu testovanú látku, pre ktorú je dobre charakterizovaná šírka odozvy. Odporúča sa zahrnúť súbežnú pozitívnu kontrolu, pretože to dokazuje kompetenciu laboratória úspešne vykonať každú skúšku a umožňuje posúdenie vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a porovnateľnosti. Pozitívnu kontrolu v každej štúdiu vyžadujú aj niektoré regulačné orgány, a preto by používatelia mali pred vykonaním LLNA: DA konzultovať s príslušnými orgánmi. Rutinné použitie súbežnej pozitívnej kontroly sa podporuje aj preto, aby sa predišlo potrebe ďalšieho testovania na zvieratách, s cieľom splniť také požiadavky, ktoré by mohli vyplývať z použitia periodickej pozitívnej kontroly (pozri odsek 12). Pozitívna kontrola by mala spôsobiť pozitívnu odozvu na LLNA: DA pri úrovni expozície, pri ktorej sa očakáva nárast stimulačného indexu (SI) $> 1,8$ v porovnaní s negatívnou kontrolnou skupinou. Dávka chemickej látky na pozitívnu kontrolu by sa mala zvoliť tak, aby nespôsobila nadmerné podráždenie kože ani systémovú toxicitu a aby indukcia bola reprodukovateľná, ale nie nadmerná (napr. SI > 10 by bol nadmerný). Vhodnými chemikáliami na pozitívnu kontrolu sú 25 % 3-fenyl-2-hexylpropanál (číslo CAS 101-86-0) a 25 % eugenol (číslo CAS 97-53-0) v acetóne: olivový olej (4: 1, objemové percentá). Môžu sa vyskytnúť okolnosti, keď sa v riadne zdôvodnených prípadoch môžu použiť iné pozitívne kontroly, ktoré spĺňajú uvedené kritériá.
12. Hoci sa odporúča súbežná pozitívna kontrolná skupina, môžu sa vyskytnúť situácie, keď môže byť vhodné periodické testovanie (t. j. v intervaloch najviac 6 mesiacov) pozitívnych kontrol v prípade tých laboratórií, ktoré vykonávajú LLNA: DA pravidelne (t. j. LLNA: DA vykonávajú v priebehu jedného mesiaca aspoň raz) a ktoré majú zavedenú historickú databázu pozitívnych kontrol, ktorá preukazuje schopnosť laboratória dosahovať reprodukovateľné a presné výsledky s pozitívnymi kontrolami. Primeranú odbornosť s použitím LLNA: DA možno úspešne preukázať dosiahnutím konzistentných pozitívnych výsledkov s pozitívnou kontrolou najmenej v 10 nezávislých testoch uskutočnených v určitom primeranom období (t. j. v období kratšom ako jeden rok).
13. Súbežná pozitívna kontrolná skupina by sa mala zahrnúť vždy, keď dôjde k procedurálnej zmene v súvislosti s LLNA: DA (napr. k zmene vyškoleného personálu, zmene materiálov a/alebo reagentov používaných pri testovacej metóde, zmene nástrojov používaných pri testovacej metóde, zmene zdroja testovaných zvierat), a takéto zmeny je potrebné zaznamenať v laboratórnych správach. Je potrebné zvážiť vplyv týchto zmien na primeranosť predtým zriadenej historickej databázy pri určovaní potreby zriadenia novej historickej databázy na zaznamenávanie konzistentnosti výsledkov pozitívnej kontroly.
14. Výskumní pracovníci by si mali uvedomiť, že rozhodnutie vykonať štúdiu pozitívnych kontrol na periodickom základe namiesto súbežných pozitívnych kontrol môže mať následky na primeranosť a prijateľnosť výsledkov negatívnej štúdie získaných bez súbežnej pozitívnej kontroly počas intervalu medzi každou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly. Ak sa dosiahne napríklad falošný negatívny výsledok v periodickej štúdiu pozitívnej kontroly, negatívne výsledky získané s testovanou látkou v intervale medzi poslednou prijateľnou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly a neprijateľnou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly možno spochybniť. Dôsledky týchto výsledkov treba dôkladne zvážiť pri určovaní toho, či vykonať súbežné pozitívne kontroly alebo iba periodické pozitívne kontroly. Treba tiež zvážiť použitie menšieho počtu zvierat v súbežnej pozitívnej kontrolnej skupine, ak je to vedecky odôvodnené a ak laboratórium na základe konkrétnych laboratórnych historických údajov preukáže, že možno použiť menší počet myší (22).

15. Aj keď by sa pozitívna kontrola mala testovať v nosiči, o ktorom je známe, že vyvoláva konzistentnú odozvu (napr. acetón: olivový olej v pomere 4: 1, objemové percentá), môžu sa vyskytnúť určité regulačné situácie, v ktorých bude potrebné vykonať aj testovanie v neštandardnom nosiči (klinicky/chemicky zodpovedajúcim roztoku) (23). Ak sa súbežná pozitívna kontrola testuje v odlišnom nosiči ako testovaná látka, potom treba do testu súbežnej pozitívnej kontroly zahrnúť samostatnú kontrolnú skupinu, ktorej sa podáva nosič.
16. V prípadoch hodnotenia látok, ktoré patria do konkrétnej chemickej triedy alebo ktoré zastupujú konkrétny rozsah odoziev, môžu byť tiež užitočné referenčné látky, aby sa preukázalo, že testovacia metóda na zisťovanie potenciálu týchto druhov látok spôsobiť senzibilizáciu kože riadne funguje. Vhodné referenčné látky majú mať tieto vlastnosti:
- štrukturálnu a funkčnú podobnosť s triedou testovanej látky, ktorá je predmetom testovania,
 - známe fyzikálno-chemické vlastnosti,
 - podporné údaje z LLNA: DA,
 - podporné údaje z ďalších zvieracích a/alebo ľudských modelov.

TESTOVACÍ POSTUP

Počet zvierat a veľkosť dávky

17. Na dávkovú skupinu sa používajú aspoň štyri zvieratá, aspoň tri koncentrácie testovanej látky a k tomu súbežná negatívna kontrolná skupina, ktorej sa podáva iba nosič testovanej látky, a pozitívna kontrola (súbežná alebo nedávna, podľa laboratórnych pravidiel s prihliadnutím na odseky 11 – 15). Treba zvážiť testovanie viacerých dávok pozitívnej kontroly, najmä ak sa testuje na prerušovanej báze. So zvieratami v kontrolných skupinách by sa malo zaobchádzať rovnakým spôsobom ako s pokusnými zvieratami okrem prípadov, keď sa ošetrovanie testovanou látkou nevykonáva.
18. Výber dávky a nosiča by mal byť založený na odporúčaníach uvedených v odkazoch (2) a (24). Následné dávky sa zvyčajne vyberajú z vhodných sérií koncentrácií, napr. 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % atď. Výber zo sérií koncentrácií je potrebné primerane vedecky zdôvodniť. Všetky existujúce informácie o toxicite (napr. akútnej toxicite a podráždení kože), ako aj štrukturálne a fyzikálno-chemické informácie o predmetnej testovanej látke (a/alebo štrukturálne príbuzných látkach) by sa mali prípadne posúdiť výberom troch po sebe idúcich koncentrácií tak, aby najvyššia koncentrácia maximalizovala expozíciu, pričom by sa však zabránilo systémovej toxicite a/alebo nadmernému lokálnemu podráždeniu kože (24) (25). Ak tieto informácie nie sú k dispozícii, možno bude potrebné vykonať predbežný skríningový test (pozri odseky 21 – 24).
19. Nosič by nemal ovplyvňovať výsledok testu a mal by sa vybrať na základe maximálnej rozpustnosti s cieľom získať najvyššiu dosiahnuteľnú koncentráciu, pričom vznikne roztok/suspenzia vhodná na aplikáciu testovanej látky. Odporúčané nosiče sú acetón: olivový olej (4: 1, objemové percentá), N,N-dimetylformamid, metyletylketón, propylénglykol a dimetylsulfoxid (6), ale môžu sa použiť aj iné nosiče, ak sa uvedie uspokojivé vedecké zdôvodnenie. V určitých situáciách môže byť potrebné použiť ako ďalšiu kontrolu klinicky vhodný roztok alebo komerčný prípravok, v ktorom sa testovaná látka predáva. Osobitnú pozornosť je potrebné venovať zabezpečeniu, aby sa hydrofilné testované látky začlenili do systémového nosiča, ktorý zvlhčuje pokožku, a rýchlo neunikli, a to začlenením vhodných rozpúšťadiel (napr. 1 % Pluronic® L92). Preto je potrebné vyhýbať sa použitiu čisto vodných nosičov.
20. Spracovanie lymfatických uzlín jednotlivých myší umožňuje posúdiť variabilitu medzi zvieratami a štatisticky porovnať rozdiel medzi meraniami testovanej látky a kontrolnej skupiny, ktorej sa podáva nosič (pozri odsek 33). Okrem toho sa zníženie počtu myší v pozitívnej kontrolnej skupine môže prehodnotiť len po poskytnutí informácií o jednotlivých zvieratách (22). Navyše niektoré regulačné orgány požadujú zber údajov o jednotlivých zvieratách. Pravidelný zber údajov o jednotlivých zvieratách poskytuje výhodu, pokiaľ ide o dobré životné podmienky zvierat, pretože sa predchádza duplicitnému testovaniu, ktoré by bolo potrebné v prípade, ak by výsledky testovanej látky pôvodne získané jedným spôsobom (napr. prostredníctvom spojených údajov o zvieratách) museli neskôr posúdiť regulačné orgány podľa iných požiadaviek (napr. prostredníctvom údajov o jednotlivých zvieratách).

Predbežný skríningový test

21. V prípade, ak nie sú k dispozícii informácie na stanovenie najvyššej dávky testovanej látky (pozri odsek 18), treba vykonať predbežný skríningový test s cieľom stanoviť primeranú úroveň testovanej dávky na použitie v LLNA: DA. Cieľom predbežného skríningového testu je poskytnúť usmernenie na výber maximálnej úrovne dávky na použitie v hlavnej štúdii LLNA: DA v prípade, že nie sú dostupné informácie o koncentracii, ktorá spôsobuje systémovú toxicitu (pozri odsek 24) a/alebo nadmerné lokálne podráždenie kože (pozri odsek 23). Maximálna úroveň testovanej dávky by mala obsahovať 100 % testovanej látky v prípade kvapalín alebo maximálnu možnú koncentráciu v prípade tuhých látok alebo suspenzií.

22. Predbežný skríningový test sa vykonáva za podmienok, ktoré sú identické s hlavnou štúdiou LLNA: DA s tým rozdielom, že sa neposudzuje proliferácia lymfatickej uzliny a môže sa použiť menší počet zvierat na dávkovú skupinu. Navrhuje sa jedno alebo dve zvieratá na dávkovú skupinu. U všetkých myší sa každý deň pozorujú klinické príznaky systémovej toxicity alebo lokálneho podráždenia v mieste aplikácie. Telesné hmotnosti zvierat sa zaznamenávajú na začiatku testu a pred usmrtením (deň 8). Obidve uši každej myši sa vyšetrí, či nemajú príznaky erytému (sčervenania kože), a vyhodnotia sa podľa tabuľky 1 (25). Hrúbka ucha sa odmeria pomocou meradla hrúbky (napr. digitálnym mikrometrom alebo meradlom hrúbky Peacock Dial) v deň 1 (pred aplikáciou dávky), v deň 3 (približne 48 hodín po prvej dávke), v deň 7 (24 hodín pred usmrtením) a v deň 8. Okrem toho možno hrúbku ucha v deň 8 určiť na základe meraní vážením vzoriek uší, ktoré by sa malo vykonať po humánnom usmrtení zvierat. Nadmerné lokálne podráždenie kože indikuje hodnotenie erytému ≥ 3 a/alebo zvýšenie hrúbky ucha o $\geq 25\%$ v ktorýkoľvek deň merania (26) (27). Najvyššia dávka vybraná pre hlavnú štúdiu LLNA: DA bude najbližšia nižšia dávka z predbežných skríningových sérií koncentrácií (pozri odsek 18), ktorá nespôsobuje systémovú toxicitu a/ani nadmerné lokálne podráždenie kože.

Tabuľka 1

Hodnotenia erytému

Pozorovanie	Hodnotenie
Žiadny erytém	0
Veľmi slabý erytém (sotva pozorovateľný)	1
Jasne ohraničený erytém	2
Mierny až silný erytém	3
Výrazný erytém (tmavočervený) až vytvorenie chrasty zabraňujúcej posúdeniu erytému	4

23. Okrem 25 % zvýšenia hrúbky ucha (26) (27) sa štatisticky významné zvýšenie hrúbky ucha v testovanej skupine myší v porovnaní s kontrolnou skupinou myší použilo aj na identifikáciu dráždivých látok v LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Štatisticky významné zvýšenie hrúbky ucha môže nastať aj vtedy, keď dôjde k zvýšeniu menšiemu ako 25 %, nespája sa však konkrétne s nadmerným podráždením kože (30) (31) (32) (33) (34).
24. Nasledujúce klinické pozorovania môžu indikovať systémovú toxicitu (35), ak sú súčasťou integrovaného posudzovania, to znamená, že môžu indikovať maximálnu úroveň dávky na použitie v hlavnej štúdii LLNA: DA: zmeny funkcie nervového systému (napr. piloerekcia, ataxia, triaška a kŕče); zmeny správania (napr. agresia, zmena pri čistení, výrazná zmena stupňa aktivity); zmena dýchania (t. j. zmena frekvencie alebo intenzity dýchania, ako napríklad zadúšanie, dýchavičnosť a šelest) a zmeny spotreby potravy a vody. Okrem toho treba v hodnotení zvážiť príznaky letargie a/alebo apatie a akékoľvek klinické príznaky silnejšej alebo dlhodobejšej bolesti a utrpenia alebo viac ako 5 % zníženie telesnej hmotnosti medzi dňom 1 a 8 a úmrtnosť. Umierajúce zvieratá alebo zvieratá, ktoré majú zjavne silné bolesti alebo vykazujú príznaky silného utrpenia, by sa mali humánnym spôsobom usmrtiť (36).

Harmonogram pokusov v hlavnej štúdii

25. Harmonogram pokusov v rámci skúšky je takýto:

- Deň 1: Označte každé zviera a zaznamenajte jeho hmotnosť a akékoľvek klinické pozorovania. Aplikujte 1 % vodný roztok laurylsulfátu sodného (SLS) na zadnú stranu každého ucha štyrmi až piatimi ťahmi kefy namočenej v roztoku SLS tak, aby bola pokrytá celá zadná strana každého ucha. Hodinu po aplikácii SLS začnite s aplikáciou 25 μ L z príslušného zriedenia testovanej látky, samotného nosiča alebo pozitívnej kontroly (súbežnej alebo nedávnej, podľa laboratórnych pravidiel s prihliadnutím na odseky 11 – 15) na zadnú stranu každého ucha.
- Dni 2, 3 a 7: Zopakujte predbežné ošetrenie 1 % vodným roztokom SLS a postup aplikácie testovanej látky vykonaný v prvom dni.
- Dni 4, 5 a 6: Žiadne ošetrenie.
- Deň 8: Zaznamenajte hmotnosť každého zvieraťa a akékoľvek klinické príznaky. Približne 24 až 30 hodín po začatí aplikácie v deň 7 sa zvieratá humánne usmrtia. Drénované ušné lymfatické uzliny sa odstraňujú z každého ucha myši a jednotlivito sa spracujú vo fosfátom tlmenom fyziologickom roztoku (PBS) pre každé zviera. Údaje a diagramy identifikácie a disekcie lymfatických uzlín možno nájsť v odkaze (22). Pri ďalšom monitorovaní lokálnej odozvy kože v hlavnej štúdii možno do protokolu štúdie zahrnúť ďalšie parametre, ako napríklad hodnotenie erytému ucha alebo merania hrúbky ucha (získané pomocou meradla hrúbky alebo vážením vzoriek uší pri pitve).

Príprava bunkových suspenzií

26. Jednobunková suspenzia buniek lymfatických uzlín (LNC) odobraná bilaterálne z každej myši sa pripravuje tak, že lymfatické uzliny sa uložia medzi dve podložné sklíčka, ktoré sa mierne stlačia, aby sa uzliny rozdrvili. Presvedčte sa, že tkanivo je rovnomerne rozložené, a potom podložné sklíčka oddelte. Rozpustite tkanivo na oboch sklíčkach vo fosfátom tlmenom fyziologickom roztoku; každé sklíčko držte v určitom uhle nad Petriho miskou a opláchnite roztokom PBS, pričom súbežne škrabkou na bunky odoberte tkanivo zo sklíčka. Navyše keďže lymfatické uzliny zvierat v negatívnej kontrole sú malé, dôležité je opatrné zaobchádzanie, aby sa predišlo umelým účinkom na hodnoty SI. Na opláchnutie obidvoch sklíčok by sa mal použiť celkový objem 1 ml roztoku PBS. Suspenzia buniek lymfatických uzlín v Petriho miske by sa mala mierne homogenizovať škrabkou na bunky. Následne sa zo suspenzie buniek lymfatických uzlín mikropipetou odoberie alikvotná časť 20 μ l, pričom sa dbá na to, aby sa neodobrala okom viditeľná membrána, a táto alikvotná časť sa zmieša s 1,98 ml roztoku PBS tak, aby sa získali 2 ml vzorky. Druhá 2 ml vzorka sa potom pripraví rovnakým postupom, takže pre každé zviera sa pripraví dve vzorky.

Stanovenie proliferácie buniek (meranie obsahu ATP v lymfocytoch)

27. Zvýšenie obsahu ATP v lymfatických uzlinách sa meria metódou, ktorá využíva luciferín/luciferázu a súpravu na meranie ATP, ktorá meria bioluminiscenciu v jednotkách relatívnej luminiscencie (RLU). Čas skúšky od času usmrtenia zvierata po meranie obsahu ATP má byť jednotný u každého zvierata a má trvať približne 30 minút, pretože obsah ATP sa zrejme po usmrtení zvierata postupne znižuje (12). Preto by sa séria postupov od odobrania ušných lymfatických uzlín až po meranie ATP mala dokončiť do 20 minút podľa vopred určeného časového plánu, ktorý je rovnaký pre každé zviera. Luminiscencia ATP by sa mala merať v každej 2 ml vzorke tak, aby sa získali dva výsledky meraní ATP pre každé zviera. Následne sa určí priemerná luminiscencia ATP, ktorá sa použije v ďalších výpočtoch (pozri odsek 30).

POZOROVANIA

Klinické pozorovania

28. Každá myš sa starostlivo vyšetrí aspoň jedenkrát denne na všetky klinické príznaky, či už ide o lokálne podráždenie v mieste aplikácie, alebo o systémovú toxicitu. Všetky pozorovania sa systematicky zaznamenávajú, pričom každá myš má individuálny záznam. Plány na monitorovanie by mali zahŕňať kritériá na rýchlu identifikáciu tých myší, ktoré vykazujú systémovú toxicitu, nadmerné lokálne podráždenie alebo poleptanie kože a ktoré majú byť humane usmrtené (36).

Telesné hmotnosti

29. Ako sa uvádza v odseku 25, telesné hmotnosti jednotlivých zvierat by sa mali odmerať na začiatku testu a pri naplánovanom usmrtení zvierat.

VÝPOČET VÝSLEDKOV

30. Výsledky v každej pokusnej skupine sa vyjadrujú ako priemerná hodnota stimulačného indexu (SI). SI sa získa vydelením priemernej hodnoty RLU/myš v rámci každej skupiny, ktorej sa podávala testovaná látka, a pozitívnej kontrolnej skupiny priemernou hodnotou RLU/myš v kontrolnej skupine, ktorej sa podávalo rozpúšťadlo/nosič. Priemerná hodnota SI kontrolných skupín, ktorým sa podával nosič, je potom 1.
31. V rozhodovacom procese sa za pozitívny výsledok považuje stimulačný index $\geq 1,8$ (10). Pri určovaní toho, či hraničný výsledok (t. j. hodnota SI v rozmedzí od 1,8 do 2,5) je pozitívny, sa však môže použiť aj sila vzťahu medzi dávkou a odozvou, štatistický význam a konzistentnosť rozpúšťadla/nosiča a odoziev pozitívnej kontroly (2) (3) (37).
32. Pri hraničnej pozitívnej odozve, keď sa SI pohybuje medzi 1,8 a 2,5, môžu používatelia na potvrdenie toho, že takéto výsledky sú pozitívne, zvážiť doplňujúce informácie, ako napríklad vzťah medzi dávkou a odozvou, dôkazy systémovej toxicity alebo nadmerného podráždenia a v prípade potreby štatistický význam spolu s hodnotami SI (10). Pozornosť by sa mala venovať aj rôznym vlastnostiam testovanej látky vrátane toho, či má štrukturálny vzťah k látkam, ktoré sú známymi senzibilizátormi kože, či spôsobuje nadmerné podráždenie kože myši, a vrátane charakteru pozorovanej odozvy na dávku. Tieto a ostatné hľadiská sa podrobne rozoberajú inde (4).
33. Zber údajov na úrovni jednotlivých myší umožní vykonať štatistickú analýzu prítomnosti a úrovne vzťahu medzi dávkou a odozvou v údajoch. Každé štatistické posúdenie by mohlo zahŕňať hodnotenie vzťahu medzi dávkou a odozvou, ako aj vhodné upravené porovnávanie testovaných skupín (napr. porovnávanie v pároch skupiny, ktorej sa podáva dávka, a súbežnej kontrolnej skupiny s rozpúšťadlom/nosičom). Štatistické analýzy môžu zahŕňať napr. lineárnu regresiu alebo Williamsov test na posúdenie trendov vo vzťahu medzi dávkou a odozvou a Dunnettov test na porovnávanie v pároch. Pri výbere vhodnej metódy štatistickej analýzy by si výskumný pracovník mal uvedomovať možné nerovnosti rozdielov a ďalšie súvisiace problémy, ktoré si môžu vyžadovať premenu údajov alebo štatistickú analýzu založenú na iných ako parametrických údajoch. Výskumný pracovník bude možno v každom prípade musieť vykonať výpočty SI a štatistické analýzy s určitými dátovými bodmi a bez nich (niekedy sa tieto údaje nazývajú „extrémne hodnoty“).

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

34. Údaje by sa mali zhrnúť vo forme tabuľky, v ktorej sa uvádzajú hodnoty RLU jednotlivých zvierat, skupinová priemerná hodnota RLU/zviera, súvisiaci rozsah chyby (napr. SD, SEM) a stredná hodnota SI pre každú dávkovú skupinu v porovnaní so súbežnou kontrolnou skupinou s rozpúšťadlom/nosičom.

Správa o teste

35. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testované a kontrolné chemické látky:

- identifikačné údaje (napr. čísla CAS, čísla EC, ak sú k dispozícii, zdroj, čistota, známe nečistoty, číslo šarže),
- fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti (napr. prchavosť, stabilita, rozpustnosť),
- v prípade zmesi zloženie a relatívny percentuálny podiel zložiek.

Rozpúšťadlo/nosič:

- identifikačné údaje (čistota, v prípade potreby koncentrácia, použitý objem),
- zdôvodnenie voľby nosiča.

Testovacie zvieratá:

- použitý kmeň myší CBA,
- mikrobiologický stav zvierat, ak je známy,
- počet a vek zvierat,
- zdroj zvierat, podmienky umiestnenia, krmivo atď.

Podmienky testu:

- zdroj, číslo šarže a kontrolné údaje výrobcu o kvalite/presnosti súpravy ATP,
- informácie o príprave a aplikácii testovanej látky,
- zdôvodnenie výberu dávky (vrátane výsledkov z predbežného skríningového testu, ak sa uskutočnil),
- použité koncentrácie nosiča a testovanej látky a celkové množstvo aplikovanej testovanej látky,
- údaje o kvalite krmiva a vody (vrátane druhu/zdroja krmiva, zdroja vody),
- podrobný opis harmonogramu podávania dávok a odberu vzoriek,
- metódy merania toxicity,
- kritériá na hodnotenie štúdií ako pozitívnych alebo negatívnych,
- informácie o akýchkoľvek odchýlkach od protokolu a vysvetlenie, ako odchýlky ovplyvňujú návrh a výsledky štúdie.

Kontrola spoľahlivosti:

- súhrn výsledkov poslednej kontroly spoľahlivosti vrátane informácií o testovanej látke, koncentracii a použitom nosiči,

- súbežné a/alebo historické kontrolné údaje o pozitívnej a súbežnej negatívnej kontrole (s rozpúšťadlom/no-sičom) pre testovacie laboratórium,
- ak nebola zahrnutá súbežná pozitívna kontrola, dátum a laboratórna správa o najaktuálnejšej periodickej pozitívnej kontrole a správa s historickými údajmi o pozitívnej kontrole, ktorými laboratórium zdôvodňuje nevykonanie súbežnej pozitívnej kontroly.

Výsledky:

- hmotnosti jednotlivých myší na začiatku podávania dávky a pri naplánovanom usmrtení, ako aj priemerný a súvisiaci rozsah chyby (napr. SD a SEM) pre každú pokusnú skupinu,
- časový priebeh nástupu príznakov toxicity u každého zvieraťa vrátane podráždenia kože v mieste podania látky, ak sa vyskytnú,
- čas usmrtenia zvieraťa a čas merania ATP u každého zvieraťa,
- tabuľka hodnôt RLU jednotlivých myší a hodnoty SI každej pokusnej skupiny s dávkou,
- priemerný a súvisiaci rozsah chyby (napr. SD, SEM) v súvislosti s hodnotami RLU/myš každej pokusnej skupiny a výsledky analýzy extrémnej hodnoty v každej pokusnej skupine,
- výpočet SI a vhodné opatrenie variability, ktoré berie do úvahy variabilitu medzi zvieratami v skupinách, ktorým sa podáva testovaná látka, a v kontrolných skupinách,
- vzťah medzi dávkou a odozvou,
- v prípade potreby štatistické analýzy.

Rozbor výsledkov:

- stručný komentár v súvislosti s výsledkami, analýza odozvy na dávku, štatistické analýzy, ak existujú, s uvedením záveru, či by sa testovaná látka mala považovať za látku spôsobujúcu senzibilizáciu kože.

LITERATÚRA

1. Chamberlain, M. and Basketter, D. A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 999 – 1002.
2. OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
3. Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Kimber, I. and Loveless, S. E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 985 – 997.
4. Basketter, D. A., Gerberick, G. F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327 – 333.
5. Van Och, F. M. M., Slob, W., De Jong, W. H., Vandebriel, R. J. and 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, 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 Publication No 99-4494. Research Triangle Park, N.C. K dispozícii na stránke: [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, 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, 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, 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 Publication No 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozícii na stránke: [<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. K dispozícii na stránke: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].
12. Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and 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, 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. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11 – 26.
14. OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [<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. and 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, 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. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90 – 96.
17. Crouch, S. P., Kozlowski, R., Slater, K. J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.*, 160, 81 – 88.
18. Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth.*, 72, 127 – 132.
19. Dexter, S. J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K. M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27 – 34.
20. Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol.*, 305, 346 – 370.
21. ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
22. ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. K dispozícii na stránke: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf].
23. McGarry, H. F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71 – 89.
24. Kimber, I., Dearman, R. J., Scholes, E. W., and Basketter, D. A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13 – 31.
25. OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].

26. Reeder, M. K., Broomhead, Y. L., DiDonato, L. and DeGeorge, G. L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 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. K dispozícii na stránke: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fdLLNA/BRDcomplete.pdf>].
28. Hayes, B. B., Gerber, P. C., Griffey, S. S. and Meade, B. J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195 – 206.
29. Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H. C., Ruzicka, T., Ahr, H. J., Lehmann, P., and Vohr, V. W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83 – 94.
30. Woolhiser, M. R., Hayes, B. B., and Meade, B. J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245 – 256.
31. Hayes, B. B., and 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, 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., and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60 – 68.
33. Vohr, H. W., and Ahr, H. J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721 – 728.
34. Patterson, R. M., Noga, E., and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 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. K dispozícii na stránke: [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, Paris. K dispozícii na stránke: [<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. and 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.*, 53 563 – 579.
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, Paris. K dispozícii na stránke: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: Miera zhody výsledkov testovacej metódy s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o opatrenie výkonnosti testovacej metódy a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často zamieňa s pojmom 'zhoda' a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (38).

Referenčná látka: Látka spôsobujúca alebo nespôsobujúca senzibilizáciu, ktorá sa používa ako štandardná látka na porovnanie s testovanou látkou. Referenčná látka by mala mať tieto vlastnosti: i) konzistentný(-é) a spoľahlivý(-é) zdroj(-e); ii) štrukturálnu a funkčnú podobnosť s triedou látok, ktoré sa budú testovať; iii) známe fyzikálno-chemické vlastnosti; iv) podporné údaje o známych účinkoch a v) známu potenciu v rozsahu želanej odozvy.

Falošný negatívny výsledok: Látka je testovanou metódou nesprávne identifikovaná ako negatívna alebo neaktívna, pričom v skutočnosti je pozitívna alebo aktívna.

Falošný pozitívny výsledok: Látka je testom nesprávne identifikovaná ako pozitívna alebo aktívna, pričom v skutočnosti je negatívna alebo neaktívna.

Nebezpečnosť: Potenciál škodlivého účinku na zdravie alebo životné prostredie. Škodlivý účinok sa prejavuje až pri dostatočnej hladine expozície.

Medzilaboratórna reprodukovateľnosť: Miera, do akej rôzne kvalifikované laboratória, ktoré používajú rovnaký protokol a testujú rovnaké testovacie látky, dokážu dosiahnuť kvalitatívne a kvantitatívne podobné výsledky. Medzilaboratórna reprodukovateľnosť sa určuje počas postupov pred validáciou a v rámci postupov validácie a znamená mieru, do akej možno test úspešne prenášať medzi laboratóriami. Takisto je známa ako reprodukovateľnosť medzi laboratóriami (38).

Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť: Určenie miery, do akej kvalifikovaní pracovníci v rámci jedného laboratória dokážu úspešne opakovať výsledky s použitím konkrétneho protokolu v rôznom čase. Takisto je známa ako reprodukovateľnosť v rámci laboratória (38).

Extrémna hodnota: Extrémna hodnota je pozorovanie, ktoré je značne odlišné od ostatných hodnôt v náhodnej vzorke z populácie.

Zabezpečovanie kvality: Riadiaci proces, v ktorom jednotlivci nezávislí od osôb vykonávajúcich testy posudzujú súlad s laboratórnymi testovacími normami, požiadavkami a postupmi vedenia záznamov, ako aj presnosť prenosu údajov.

Spôľahlivosť: Mera rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda počas istého časového obdobia opakovane vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti (38).

Senzibilizácia kože: Imunologický proces, ku ktorému dochádza po lokálnom vystavení náchylného jednotlivca chemickému alergénu, ktorý vyvoláva kožnú imunitnú reakciu, ktorá môže viesť k vytvoreniu kontaktnej senzibilizácie.

Stimulačný index (SI): Hodnota vypočítaná na posúdenie potenciálu testovanej látky spôsobiť senzibilizáciu kože; ide teda o pomer proliferácie v pokusných skupinách a proliferácie v súbežných kontrolných skupinách, ktorým sa podáva nosič.

Testovaná látka (tiež sa nazýva testovaná chemikália): Akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

B. 51. SENZIBILIZÁCIA KOŽE: LOKÁLNA SKÚŠKA LYMFATICKÝCH UZLÍN: BRDU-ELISA

ÚVOD

1. Usmernenia Organizácie pre hospodársku spoluprácu a rozvoj (OECD) na testovanie chemikálií a testovacie metódy EÚ sa pravidelne revidujú vzhľadom na vedecký pokrok, zmeny regulačných potrieb a dobré životné podmienky zvierat. Prvá testovacia metóda (TM) (B.42) na stanovenie senzibilizácie kože u myší, tzv. lokálna skúška lymfatických uzlín (LLNA; usmernenie OECD na vykonávanie testov 429) bola zrevidovaná (1 a kapitola B.42 v tejto prílohe). Podrobnosti validácie LLNA a revízia prác v tejto oblasti boli uverejnené (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Pri LLNA sa na meranie proliferácie lymfocytov používa rádioizotopický tymidín alebo jód, a preto má táto skúška obmedzené použitie v tých prípadoch, kde je problematické získavanie, použitie alebo likvidácia rádioaktívnych látok. LLNA: BrdU-ELISA [enzýmová imunoskúška] je nerádioaktívna modifikácia testovacej metódy LLNA, ktorá na meranie proliferácie lymfocytov využíva 5-bróm-2-deoxyuridín (BrdU) (číslo CAS 59-14-3) v systéme testovania založenom na ELISA. LLNA: BrdU-ELISA bola validovaná a zrevidovaná a odporúča ju medzinárodný nezávislý vedecký panel pre partnerské preskúmanie ako užitočnú metódu na identifikáciu chemikálií spôsobujúcich alebo nespôsobujúcich senzibilizáciu kože s určitými obmedzeniami (10) (11) (12). Táto testovacia metóda je vytvorená na posúdenie potenciálu chemikálií (látok a zmesí) spôsobiť senzibilizáciu kože u zvierat. Metóda opísaná v kapitole B.6 tejto prílohy a usmernení OECD na vykonávanie testov 406 využíva testy s morčatami, a to maximalizačný test morčiat a Buehlerov test (13). LLNA (kapitola B.42 tejto prílohy; usmernenie OECD na vykonávanie testov 429) a dve nerádioaktívne modifikácie LLNA: BrdU-ELISA (kapitola B.51 tejto prílohy; usmernenie OECD na vykonávanie testov 442 B) a LLNA: DA (kapitola B.50 tejto prílohy; usmernenie OECD na vykonávanie testov 442 A) poskytujú výhodu v porovnaní s testami na morčatách opísanými v kapitole B.6 a usmernení OECD na vykonávanie testov 406 (13), a to pokiaľ ide o obmedzenie a zdokonalenie využívania zvierat.

2. Podobne ako LLNA, LLNA: BrdU-ELISA skúma indukčnú fázu senzibilizácie kože a poskytuje kvantitatívne údaje vhodné na posúdenie odozvy na dávku. Okrem toho schopnosť identifikovať látky spôsobujúce senzibilizáciu kože bez potreby používania rádioaktívneho značenia DNA znižuje potenciál expozície rádioaktivity pri práci a problémy v súvislosti s likvidáciou odpadu. To môže následne umožniť zvýšené využívanie myší na identifikáciu látok spôsobujúcich senzibilizáciu kože, čo by ďalej mohlo znížiť využívanie morčiat na testovanie potenciálu senzibilizácie kože (t. j. B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13).

VYMEDZENIE POJMOV

3. Použité definície sú uvedené v dodatku 1.

ÚVODNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

4. LLNA: BrdU-ELISA je upravená metóda LLNA na identifikáciu potenciálu chemikálií spôsobiť senzibilizáciu kože, ktorá má určité obmedzenia. Neznamená to nevyhnutne, že vo všetkých prípadoch sa má použiť LLNA: BrdU-ELISA namiesto testu LLNA alebo testov s morčatami (t. j. metóda B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13), ale skôr to, že táto skúška je rovnako hodnotná a môže sa použiť ako alternatíva, v ktorej pozitívne a negatívne výsledky vo všeobecnosti nevyžadujú ďalšie potvrdenie. Testovacie laboratórium by malo posúdiť všetky dostupné informácie o testovanej látke pred uskutočnením štúdie. Takéto informácie budú obsahovať identitu a chemickú štruktúru testovanej látky, jej fyzikálno-chemické vlastnosti, výsledky všetkých ostatných *in vitro* alebo *in vivo* testov toxicity s testovanou látkou a toxikologické údaje o štruktúrne príbuzných chemikáliách. Tieto informácie treba vziať do úvahy pri určovaní, či LLNA: BrdU-ELISA je pre testovanú látku vhodná [vzhľadom na nezlúčiteľnosť obmedzených druhov chemikálií s LLNA: BrdU-ELISA (pozri odsek 5)] a ako pomoc pri výbere dávok.
5. LLNA: BrdU-ELISA je metóda *in vivo*, a to znamená, že pri posudzovaní aktivity alergickej kontaktnej senzibilizácie sa nevylučuje používanie zvierat. Má však potenciál obmedziť používanie zvierat na tento účel pri porovnaní s testami na morčatách (B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13). Okrem toho LLNA: BrdU-ELISA ponúka značné zmenenie spôsobu, akým sa zvieratá používajú na testy alergickej kontaktnej senzibilizácie, keďže na rozdiel od metódy B.6 a usmernenia OECD na vykonávanie testov 406 LLNA: BrdU-ELISA nevyžaduje, aby sa vyvolali reakcie dermálnej hypersenzitivity. Okrem toho LLNA: BrdU-ELISA nevyžaduje použitie adjuvansu ako v prípade maximalizačného testu morčiat (kapitola B.6 tejto prílohy, 13). Testovacia metóda LLNA: BrdU-ELISA tak znižuje utrpenie zvierat. Napriek výhodám, ktoré LLNA: BrdU-ELISA má v porovnaní s metódou B.6 a usmernením OECD na vykonávanie testov 406 (13), existujú určité obmedzenia, pre ktoré možno bude potrebné používať B.6 alebo usmernenie OECD na vykonávanie testov 406 [napr. testovanie určitých kovov, falošné pozitívne zistenia s určitými kožnými dráždivými látkami (ako napríklad niektoré povrchovo aktívne látky) (6) (1 a kapitola B.42 tejto prílohy) alebo rozpustnosť testovanej látky]. Okrem toho chemické triedy alebo látky, ktoré obsahujú potenciálne zmätočné funkčné skupiny (15), si tiež môžu vyžadovať použitie testov s morčatami (t. j. B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13). Obmedzenia, ktoré boli identifikované pre LLNA (1 a kapitola B.42 tejto prílohy), sa odporúčajú aj pre LLNA: BrdU-ELISA (10). Okrem takto identifikovaných obmedzení by sa LLNA: BrdU-ELISA mala uplatňovať pri testovaní akýchkoľvek chemikálií okrem prípadu, keď tieto chemikálie majú vlastnosti, ktoré by mohli narušovať presnosť LLNA: BrdU-ELISA. Okrem toho by sa mala zvážiť možnosť hraničných pozitívnych výsledkov v prípade, že sa dosiahnu hodnoty stimulačného indexu (SI) od 1,6 do 1,9 (pozri odseky 31 a 32). To je založené na validačnej databáze 43 látok s použitím SI $\geq 1,6$ (pozri odsek 6), pre ktoré LLNA: BrdU-ELISA správne identifikovala všetkých 32 látok spôsobujúcich senzibilizáciu podľa LLNA, ale nesprávne identifikovala dve z 11 látok nespôsobujúcich senzibilizáciu podľa LLNA s hodnotami SI od 1,6 do 1,9 (t. j. hraničný pozitívny výsledok) (10). Keďže sa však na stanovenie hodnôt SI a výpočet predpokladaných vlastností testu použil rovnaký súbor údajov, stanovené údaje môžu byť nadhodnotením skutočných prediktívnych vlastností.

PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

6. Základným princípom, na ktorom sa LLNA: BrdU-ELISA zakladá, je, že senzibilizátory vyvolávajú proliferáciu lymfocytov v lymfatickej uzline v drénovanom mieste aplikácie testovanej látky. Táto proliferácia je úmerná dávke a účinnosti aplikovaného alergénu a poskytuje jednoduchý prostriedok na získanie kvantitatívneho merania senzibilizácie. Proliferácia sa meria porovnávaním priemernej proliferácie v každej pokusnej skupine s priemerou proliferáciou v kontrolnej skupine, ktorej sa podáva nosič. Určí sa pomer priemernej proliferácie v každej ošetrenej skupine a priemernej proliferácie v súbežnej kontrolnej skupine s nosičom, ktorý sa označuje ako stimulačný index (SI), a mal by mať hodnotu $\geq 1,6$ pred ďalším prípadným vyhodnotením testovanej látky ako potenciálneho senzibilizátora kože. Uvedené metódy sú založené na meraní obsahu BrdU na preukázanie proliferácie zvýšeného počtu buniek v drénovaných ušných lymfatických uzlinách. BrdU je podobný tymidínu a je podobne začlenený do DNA proliferujúcich buniek. Začlenenie BrdU sa meria metódou ELISA, ktorá využíva peroxidázou označenú protilátku špecifickú pre BrdU. Peroxidáza po pridaní substrátu reaguje so substrátom produkujúcim sfarbený produkt, ktorý sa kvantifikuje pri konkrétnej absorbcii na mikrotitračnej platničke.

OPIS SKÚŠKY**Výber druhov zvierat**

7. Vybraným druhom pre tento test je myš. Validačné štúdie LLNA: BrdU-ELISA sa vykonávali výlučne s myšami kmeňa CBA/JN, ktorý sa preto považuje za preferovaný kmeň (10) (12). Použijú sa mladé dospelé negravídne samice myši, ktoré nikdy nevrhli mláďatá. Na začiatku štúdie by zvieratá mali byť vo veku 8 – 12 týždňov a rozdiel medzi hmotnosťami zvierat má byť minimálny a nemá byť vyšší ako 20 % priemernej hmotnosti. Alternatívne sa môžu použiť iné kmene a samce, ak sa na základe údajov dá uspokojivo dokázať, že neexistujú významné odlišnosti špecifické pre kmeň a/alebo pohlavie v odozve na LLNA: BrdU-ELISA.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

8. Myši by sa mali umiestniť v skupinách (16) okrem prípadu, ak sa poskytne primerané vedecké odôvodnenie ich umiestnenia jednotlivu. Teplota miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 ± 3 °C. Aj keď by relatívna vlhkosť mala byť aspoň 30 % a pokiaľ možno by nemala prevyšovať 70 % okrem obdobia počas čistenia miestnosti, cieľom je, aby relatívna vlhkosť dosahovala 50 % – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody.

Príprava zvierat

9. Zvieratá sa vyberú náhodne a sú označené tak, aby sa umožnila jednotlivá identifikácia (ale nie formou ušných značiek), a držia sa v kliečkach aspoň 5 dní pred začiatkom podávania dávok, aby sa aklimatizovali na laboratórne podmienky. Pred začatím ošetrovania sa všetky zvieratá vyšetrí, aby sa zaistilo, že nemajú žiadne viditeľné kožné poranenia.

Príprava dávok

10. Chemikálie v tuhom skupenstve by sa pred podaním dávky do ucha myši mali rozpustiť alebo suspendovať v rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je to vhodné, rozriediť. Kvapalné chemikálie možno podávať priamo alebo pred podaním rozriediť. V prípade nerozpustných chemikálií, ako napríklad tých, ktoré sa vo všeobecnosti používajú ako zdravotnícke pomôcky, by sa pred podaním dávky do ucha myši mala uskutočniť zvýšená extrakcia vo vhodnom rozpúšťadle, aby sa odhalili všetky extrahovateľné zložky, ktoré sa budú testovať. Testované látky sa pripravujú každý deň okrem prípadu, keď údaje o stabilite preukazujú prijateľnosť uskladnenia.

Kontrola spoľahlivosti

11. Riadne vykonanie skúšky sa dokazuje pomocou pozitívnych kontrolných chemikálií, ktoré reagujú primeranou a reprodukovateľnou citlivosťou ako senzibilizujúce testované látky, pre ktoré je dobre charakterizovaná šírka odozvy. Odporúča sa zahrnúť súbežnú pozitívnu kontrolu, pretože to dokazuje kompetenciu laboratória úspešne vykonať každú skúšku a umožňuje posúdenie vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a porovnateľnosti. Pozitívnu kontrolu v každej štúdii vyžadujú aj niektoré regulačné orgány, a preto by používatelia mali pred vykonaním LLNA: BrdU-ELISA konzultovať s príslušnými orgánmi. Rutinné použitie súbežnej pozitívnej kontroly sa podporuje aj preto, aby sa predišlo potrebe ďalšieho testovania na zvieratách s cieľom splniť také požiadavky, ktoré by mohli vzniknúť z použitia periodickej pozitívnej kontroly (pozri odsek 12). Pozitívna kontrola by mala spôsobiť pozitívnu odozvu na LLNA: BrdU-ELISA pri úrovni expozície, pri ktorej sa očakáva nárast stimulačného indexu (SI) $> 1,6$ v porovnaní s negatívnou kontrolnou (NC) skupinou. Dávka chemickej látky na pozitívnu kontrolu by sa mala zvoliť tak, aby nespôsobila nadmerné podráždenie kože ani systémovú toxicitu a aby indukcia bola reprodukovateľná, ale nie nadmerná (napr. SI > 14 by bol nadmerný). Vhodnými chemikáliami na pozitívnu kontrolu sú: 25 % 3-fenyl-2-hexylpropanál (číslo CAS 101-86-0) a 25 % eugenol (číslo CAS 97-53-0) v acetóne; olivový olej (4: 1, objemové percentá). Môžu sa vyskytnúť okolnosti, keď sa v riadne zdôvodnených prípadoch môžu použiť iné pozitívne kontroly, ktoré spĺňajú uvedené kritériá.
12. Hoci sa odporúča zahrnutie súbežnej pozitívnej kontrolnej skupiny, môžu sa vyskytnúť situácie, keď periodické testovanie (v intervaloch ≤ 6 mesiacov) s pozitívnou kontrolou môže byť vhodné v prípade tých laboratórií, ktoré vykonávajú LLNA: BrdU-ELISA pravidelne (t. j. vykonávajú LLNA: BrdU-ELISA v priebehu jedného mesiaca aspoň raz) a ktoré majú zavedenú historickú databázu pozitívnych kontrol, ktorá preukazuje schopnosť laboratória dosahovať reprodukovateľné a presné výsledky v pozitívnych kontrolách. BrdU-ELISA možno úspešne preukázať dosiahnutím konzistentných pozitívnych výsledkov v pozitívnej kontrole najmenej v 10 nezávislých testoch uskutočnených v určitom primeranom období (t. j. v období kratšom ako jeden rok).
13. Súbežná pozitívna kontrolná skupina sa má zahrnúť vždy, keď dôjde k procedurálnej zmene v súvislosti s LLNA: BrdU-ELISA (napr. k zmene vyškoleného personálu, zmene materiálov a/alebo reagentov používaných pri testovacej metóde, zmene nástrojov používaných pri testovacej metóde alebo zmene zdroja testovaných zvierat), a takéto zmeny je potrebné zaznamenať v laboratórnych správach. Je potrebné zvážiť vplyv týchto zmien na primeranosť predtým zriadenej historickej databázy pri určovaní potreby zriadenia novej historickej databázy na zaznamenávanie konzistentnosti výsledkov pozitívnej kontroly.

14. Výskumní pracovníci by si mali uvedomiť, že rozhodnutie vykonať štúdiu pozitívnych kontrol na periodickom základe namiesto súbežných pozitívnych kontrol môže mať následky na primeranosť a prijateľnosť výsledkov negatívnej štúdie získaných bez súbežnej pozitívnej kontroly počas intervalu medzi každou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly. Ak sa dosiahne napríklad falošný negatívny výsledok v periodickej štúdii pozitívnej kontroly, negatívne výsledky získané s testovanou látkou v intervale medzi poslednou prijateľnou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly a neprijateľnou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly možno spochybniť. Dôsledky týchto výsledkov treba dôkladne zvážiť pri určovaní toho, či vykonať súbežné pozitívne kontroly, alebo iba periodické pozitívne kontroly. Treba tiež zvážiť použitie menšieho počtu zvierat v súbežnej pozitívnej kontrolnej skupine, ak je to vedecky odôvodnené a ak laboratórium na základe konkrétnych laboratórnych historických údajov preukáže, že možno použiť menší počet myší (17).
15. Aj keď by sa pozitívna kontrola mala testovať v nosiči, o ktorom je známe, že vyvoláva konzistentnú odozvu (napr. acetón: olivový olej v pomere 4: 1, objemové percentá), môžu sa vyskytnúť určité regulačné situácie, v ktorých bude potrebné vykonať aj testovanie v neštandardnom nosiči (klinicky/chemicky zodpovedajúcim roztoku) (18). Ak sa súbežná pozitívna kontrola testuje v odlišnom nosiči ako testovaná látka, potom treba do testu súbežnej pozitívnej kontroly zahrnúť samostatnú kontrolnú skupinu, ktorej sa podáva nosič.
16. V prípadoch hodnotenia testovaných látok, ktoré patria do konkrétnej chemickej triedy, alebo rozsahu odoziev môžu byť užitočné aj referenčné látky, aby sa preukázalo, že testovacia metóda na zisťovanie potenciálu týchto druhov testovaných látok spôsobiť senzibilizáciu kože funguje riadne. Vhodné referenčné látky majú mať tieto vlastnosti:
- štrukturálnu a funkčnú podobnosť s triedou testovanej látky, ktorá je predmetom testovania,
 - známe fyzikálno-chemické vlastnosti,
 - podporné údaje z LLNA: BrdU-ELISA,
 - podporné údaje z ďalších zvieracích a/alebo ľudských modelov.

TESTOVACÍ POSTUP

Počet zvierat a veľkosť dávky

17. Na dávkovú skupinu sa používajú aspoň štyri zvieratá, aspoň tri koncentrácie testovanej látky a k tomu súbežná negatívna kontrolná skupina, ktorej sa podáva iba nosič pre testovanú látku, a pozitívna kontrolná skupina (súbežná alebo súčasná, podľa laboratórnych pravidiel v súvisiacich odsekoch 11 – 15). Treba zvážiť testovanie viacerých dávok pozitívnej kontroly, najmä ak sa testuje na prerušovanej báze. So zvieratami v kontrolných skupinách by sa malo zaobchádzať rovnakým spôsobom ako s pokusnými zvieratami okrem prípadov, keď sa ošetrovanie testovanou látkou nevykonáva.
18. Výber dávky a nosiča by mal byť založený na odporúčaníach uvedených v odkazoch 2 a 19. Následné dávky sa zvyčajne vyberajú z vhodných sérií koncentrácií, napr. 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % atď. Výber zo sérií koncentrácií je potrebné primerane vedecky zdôvodniť. Všetky existujúce informácie o toxicite (napr. akútna toxicita a podráždenie kože), ako aj štrukturálne a fyzikálno-chemické informácie o testovanej látke, ktorá je predmetom záujmu (a/alebo štrukturálne príbuzných látkach), ak sú k dispozícii, by sa mali posúdiť výberom troch po sebe idúcich koncentrácií tak, aby najvyššia koncentrácia maximalizovala expozíciu, pričom by sa však zabránilo systémovej toxicite a/alebo nadmernému lokálnemu podráždeniu kože (19) (20 a kapitola B.4 tejto prílohy). Ak tieto informácie nie sú k dispozícii, možno bude potrebné vykonať predbežný skríningový test (pozri odseky 21 – 24).
19. Nosič by nemal ovplyvňovať výsledok testu a mal by sa vybrať na základe maximálnej rozpustnosti s cieľom získať najvyššiu dosiahnuteľnú koncentráciu, pričom vznikne roztok/suspenzia vhodná na aplikáciu testovanej látky. Odporúčané nosiče sú: acetón: olivový olej (4: 1, objemové percentá), N,N-dimetylformamid, metyletylketón, propylénglykol a dimetylsulfoxid (6), ale môžu sa použiť aj iné, ak sa uvedie uspokojivé vedecké zdôvodnenie. V určitých situáciách môže byť potrebné použiť ako ďalšiu kontrolu klinicky vhodný roztok alebo komerčný prípravok, v ktorom sa testovaná látka predáva. Osobitnú pozornosť je potrebné venovať zabezpečeniu toho, aby sa hydrofilné testované látky začlenili do systému nosiča, ktorý zvlhčuje pokožku, a rýchlo neunikli, a to začlenením vhodných rozpúšťadiel (napr. 1 % Pluronic® L92). Preto je potrebné vyhýbať sa použitiu čisto vodných nosičov.
20. Spracovanie lymfatických uzlín jednotlivých myší umožňuje posúdiť variabilitu medzi zvieratami a štatisticky porovnať rozdiel medzi meraniami testovanej látky a kontrolnej skupiny, ktorej sa podáva nosič (pozri odsek 33). Okrem toho sa zníženie počtu myší v pozitívnej kontrolnej skupine môže prehodnotiť len po poskytnutí informácií o jednotlivých zvieratách (17). Navyše niektoré regulačné orgány požadujú zber údajov o jednotlivých zvieratách. Pravidelný zber údajov o jednotlivých zvieratách poskytuje výhodu, pokiaľ ide o dobré životné podmienky zvierat, pretože sa predchádza duplicitnému testovaniu, ktoré by bolo potrebné v prípade, ak by výsledky testovanej látky pôvodne získané jedným spôsobom (napr. prostredníctvom spojených údajov o zvieratách) museli neskôr posúdiť regulačné orgány podľa iných požiadaviek (napr. prostredníctvom údajov o jednotlivých zvieratách).

Predbežný skríningový test

21. V prípade, ak nie sú k dispozícii informácie na stanovenie najvyššej dávky testovanej látky (pozri odsek 18), treba vykonať predbežný skríningový test s cieľom stanoviť primeranú úroveň testovanej dávky na použitie v LLNA: BrdU-ELISA. Cieľom predbežného skríningového testu je poskytnúť usmernenie na výber maximálnej úrovne dávky na použitie v hlavnej štúdii LLNA: BrdU-ELISA v prípade, že nie sú dostupné informácie o koncentrácii, ktorá spôsobuje systémovú toxicitu (pozri odsek 24) a/alebo nadmerné lokálne podráždenie kože (pozri odsek 23). Maximálna úroveň testovanej dávky by mala obsahovať 100 % testovanej látky v prípade kvapalín alebo maximálnu možnú koncentráciu v prípade tuhých látok alebo suspenzií.
22. Predbežný skríningový test sa vykonáva za podmienok, ktoré sú identické s hlavnou štúdiou LLNA: BrdU-ELISA, s tým rozdielom, že sa neposudzuje proliferácia lymfatickej uzliny a môže sa použiť menší počet zvierat na dávkovú skupinu. Navrhne sa jedno alebo dve zvieratá na dávkovú skupinu. U všetkých myší sa každý deň pozorujú klinické príznaky systémovej toxicity alebo lokálneho podráždenia v mieste aplikácie. Telesné hmotnosti zvierat sa zaznamenávajú na začiatku testu a pred usmrtením (deň 6). Obidve uši myší sa vyšetrí, či nemajú príznaky erytému (sčervenania kože), a vyhodnotia sa podľa tabuľky 1 (20 a kapitola B.4 tejto prílohy). Hrúbka ucha sa meria pomocou meradla hrúbky (napr. digitálnym mikrometrom alebo meradlom hrúbky Peacock Dial) v deň 1 (pred aplikáciou dávky), v deň 3 (približne 48 hodín po prvej dávke) a v deň 6. Okrem toho možno hrúbku ucha v deň 6 určiť na základe meraní vážením vzoriek uší, ktoré by sa malo vykonať po humánnom usmrtení zvierat. Nadmerné lokálne podráždenie kože indikuje hodnotenie erytému ≥ 3 a/alebo zvýšenie hrúbky ucha o ≥ 25 % v ktorýkoľvek deň merania (21) (22). Najvyššia dávka vybraná pre hlavnú štúdiu LLNA: BrdU-ELISA bude najbližšia nižšia dávka z predbežných skríningových sérií koncentrácií (pozri odsek 18), ktorá nespôsobuje systémovú toxicitu a/ani nadmerné lokálne podráždenie kože.

Tabuľka 1

Hodnotenia erytému

Pozorovanie	Hodnotenie
Žiadny erytém	0
Veľmi slabý erytém (sotva pozorovateľný)	1
Jasne ohraničený erytém	2
Mierny až silný erytém	3
Výrazný erytém (tmavočervený) až vytvorenie chrasty zabraňujúcej posúdeniu erytému	4

23. Okrem 25 % zvýšenia hrúbky ucha (21) (22) sa štatisticky významné zvýšenie hrúbky ucha v testovanej skupine myší v porovnaní s kontrolnou skupinou myší tiež použilo na identifikáciu dráždivých látok v skúške LLNA (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Kým štatisticky významné zvýšenia môžu nastať, aj keď dôjde k zvýšeniu hrúbky ucha menšiemu ako 25 %, nie sú však konkrétne spájané s nadmerným podráždením kože (25) (26) (27) (28) (29).
24. Nasledujúce klinické pozorovania môžu indikovať systémovú toxicitu (30), ak sú súčasťou integrovaného posudzovania, to znamená, že môžu indikovať maximálnu dávku na použitie v hlavnej LLNA: BrdU-ELISA: zmeny funkcie nervového systému (napr. piloerekcia, ataxia, triaška a kŕče), zmeny správania (napr. agresia, zmena pri čistení, výrazná zmena stupňa aktivity), zmena dýchania (t. j. zmena frekvencie alebo intenzity dýchania, ako napríklad zadúšanie, dýchavičnosť a šelest) a zmeny spotreby potravy a vody. Okrem toho treba v hodnotení zvážiť príznaky letargie a/alebo apatie a akékoľvek klinické príznaky silnejšej alebo dlhodobejšej bolesti a utrpenia alebo viac ako 5 % zníženie telesnej hmotnosti medzi dňom 1 a 6 a úmrtnosť. Umierajúce zvieratá alebo zvieratá, ktoré majú zjavne silné bolesti alebo vykazujú príznaky silného utrpenia, by sa mali humánnym spôsobom usmrtiť (31).

Harmonogram pokusov v hlavnej štúdii

25. Harmonogram pokusov v rámci skúšky je takýto:

- Deň 1: Označte každé zviera a zaznamenajte jeho hmotnosť a akékoľvek klinické pozorovania. Začnite s aplikáciou 25 μ l z príslušného zriedenia testovanej látky, samotného nosiča alebo pozitívnej kontroly (súbežnej alebo nedávnej, podľa laboratórnych pravidiel s prihliadnutím na odseky 11 – 15) na zadnú stranu každého ucha.
- Dni 2 a 3: Zopakujte aplikačný postup uskutočnený v deň 1.
- Deň 4: Žiadne ošetrovanie.
- Deň 5: Intraperitoneálnou injekciou aplikujte 0,5 ml (5 mg/myš) roztoku BrdU (10 mg/ml).

- Deň 6: Zaznamenajte hmotnosť každého zvieraťa a akékoľvek klinické príznaky. Približne o 24 hodín po injekčnej aplikácii roztoku BrdU sa zvieratá humane usmrť. Drénované ušné lymfatické uzliny sa odstránia z každého ucha myši a jednotlivito sa spracujú vo fosfátom tlmenom fyziologickom roztoku (PBS) pre každé zviera. Údaje a diagramy identifikácie lymfatických uzlín a disekcie možno nájsť v odkaze (17). Pri ďalšom monitorovaní lokálnej odozvy kože v hlavnej štúdii možno do protokolu štúdie zahrnúť ďalšie parametre, ako napríklad hodnotenie erytému ucha alebo merania hrúbky ucha (získané pomocou meradla hrúbky alebo vážením vzoriek uší pri pitve).

Príprava bunkových suspenzií

26. Jednobunková suspenzia buniek lymfatických uzlín (LNC) odobraná bilaterálne z každej myši sa pripravuje jemným mechanickým pretlačením cez sitko z nerezovej ocele so šírkou oka 200 µm alebo inou prijateľnou technikou na prípravu jednobunkovej suspenzie (napr. pomocou plastového mažiara na jedno použitie, ktorým sa lymfatické uzliny rozdrví a následne prepasirujú cez nylonové sitko #70.) Postup na prípravu suspenzie buniek lymfatických uzlín je v tejto skúške veľmi dôležitý, a preto by každý odborník mal byť v tomto postupe vopred vyskolený. Navyše keďže lymfatické uzliny zvierat v negatívnej kontrole sú malé, dôležité je opatrné zaobchádzanie, aby sa predišlo umelým účinkom na hodnoty SI. V každom prípade by sa cieľový objem suspenzie buniek lymfatických uzlín mal prispôbiť stanovenému optimalizovanému objemu (približne 15 ml). Optimalizovaný objem je založený na dosiahnutí priemernej absorbancie v negatívnej kontrolnej skupine v rozmedzí 0,1 – 0,2.

Stanovenie proliferácie buniek (meranie obsahu BrdU v DNA lymfocytov)

27. BrdU sa meria metódou ELISA pomocou komerčnej testovacej súpravy (napr. Roche Applied Science, Mannheim, Nemecko, katalógové číslo 11 647 229 001). V skratke 100 µl suspenzie buniek lymfatických uzlín sa trikrát pridá do jamiek mikroplošnice. Po fixácii a denaturácii buniek lymfatických uzlín sa do každej jamky pridá protilátka BrdU a čaká sa na reakciu. Následne sa protilátka BrdU odstráni umytím, pridá sa substrátový roztok a čaká sa na tvorbu chromogénu. Odmeria sa absorbancia 370 nm s referenčnou vlnovou dĺžkou 492 nm. Vo všetkých prípadoch by sa testovacie podmienky skúšky mali optimalizovať (pozri odsek 26).

POZOROVANIA

Klinické pozorovania

28. Každá myš sa starostlivo vyšetrí aspoň jedenkrát denne na všetky klinické príznaky, či už ide o lokálne podráždenie v mieste aplikácie, alebo systémovú toxicitu. Všetky pozorovania sa systematicky zaznamenávajú, pričom každá myš má individuálny záznam. Plány na monitorovanie by mali zahŕňať kritériá na rýchlu identifikáciu tých myší, ktoré vykazujú systémovú toxicitu, nadmerné lokálne podráždenie alebo poleptanie kože a ktoré majú byť humane usmrtené (31).

Telesné hmotnosti

29. Ako sa uvádza v odseku 25, hmotnosti jednotlivých zvierat by sa mali odmerať na začiatku testu a pri naplánovanom humane usmrtení zvierat.

VÝPOČET VÝSLEDKOV

30. Výsledky v každej pokusnej skupine sa vyjadrujú ako priemerná hodnota stimulačného indexu (SI). SI sa vypočíta vydelením priemerného indexu označenia BrdU/myš v rámci každej skupiny, ktorej sa podáva testovaná látka, a pozitívnej kontrolnej skupiny priemerným indexom označenia BrdU v kontrolnej skupine s rozpúšťadlom/nosičom. Priemerná hodnota SI kontrolných skupín, ktorým sa podával nosič, je potom 1.

Index označenia BrdU sa definuje ako:

$$\text{Index označenia BrdU} = (\text{ABS}_{\text{em}} - \text{ABS}_{\text{prázdny}_{\text{em}}}) - (\text{ABS}_{\text{ref}} - \text{ABS}_{\text{prázdny}_{\text{ref}}}),$$

kde: em = emisná vlnová dĺžka a ref = referenčná vlnová dĺžka.

31. V rozhodovacom procese sa za pozitívny výsledok považuje stimulačný index $\geq 1,6$ (10). Pri určovaní toho, či hraničný výsledok (napr. hodnota SI v rozmedzí od 1,6 do 1,9) je pozitívny, sa však môže použiť aj sila vzťahu medzi dávkou a odozvou, štatistický význam a konzistentnosť rozpúšťadla/nosiča a odoziev pozitívnej kontroly (3) (6) (32).
32. Pri hraničnom výsledku SI od 1,6 do 1,9 môžu používatelia na potvrdenie toho, že také výsledky sú pozitívne, zvážiť doplnujúce informácie, ako napríklad vzťah medzi dávkou a odozvou, dôkazy systémovej toxicity alebo nadmerného podráždenia a v prípade potreby štatistický význam spolu s hodnotami SI (10). Pozornosť by sa mala venovať aj rôznym vlastnostiam testovanej látky vrátane toho, či má štrukturálny vzťah k látkam, ktoré sú známymi senzibilizátormi, či spôsobuje nadmerné podráždenie kože, a vrátane charakteru pozorovanej odozvy na dávku. Tieto a ostatné hľadiská sa podrobne rozoberajú inde (4).

33. Zber údajov na úrovni jednotlivých myší umožní vykonať štatistickú analýzu prítomnosti a úrovne vzťahu medzi dávkou a odozvou v údajoch. Každé štatistické posúdenie by mohlo zahŕňať hodnotenie vzťahu medzi dávkou a odozvou, ako aj vhodné upravené porovnávanie testovaných skupín (napr. porovnávanie v pároch skupiny, ktorej sa podáva dávka, a súbežnej kontrolnej skupiny s rozpúšťadlom/nosičom). Štatistické analýzy môžu zahŕňať napr. lineárnu regresiu alebo Williamsov test na posúdenie trendov vo vzťahu medzi dávkou a odozvou a Dunnettov test na porovnávanie v pároch. Pri výbere vhodnej metódy štatistickej analýzy by si výskumný pracovník mal uvedomovať možné nerovnosti rozdielov a ďalšie súvisiace problémy, ktoré si môžu vyžadovať premenu údajov alebo štatistickú analýzu založenú na iných ako parametrických údajoch. Výskumný pracovník bude možno v každom prípade musieť vykonať výpočty SI a štatistické analýzy s určitými dátovými bodmi a bez nich (niekedy sa tieto údaje nazývajú „extrémne hodnoty“).

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

34. Údaje by sa mali zhrnúť vo forme tabuľky, v ktorej sa uvádzajú hodnoty indexu označenia BrdU jednotlivých zvierat, priemerný skupinový index označenia BrdU/zviera, súvisiaci rozsah chyby (napr. SD, SEM) a stredná hodnota SI pre každú skupinu s dávkou v porovnaní so súbežnou kontrolnou skupinou s rozpúšťadlom/nosičom.

Správa o teste

35. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testované a kontrolné chemické látky:

- identifikačné údaje (napr. čísla CAS, čísla EC, ak sú k dispozícii, zdroj, čistota, známe nečistoty, číslo šarže),
- fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti (napr. prchavosť, stabilita, rozpustnosť),
- v prípade zmesi zloženie a relatívny percentuálny podiel zložiek.

Rozpúšťadlo/nosič:

- identifikačné údaje (čistota, v prípade potreby koncentrácia, použitý objem),
- zdôvodnenie voľby nosiča.

Testovacie zvieratá:

- použitý kmeň myší CBA,
- mikrobiologický stav zvierat, ak je známy,
- počet a vek zvierat,
- zdroj zvierat, podmienky umiestnenia, krmivo atď.

Podmienky testu:

- zdroj, číslo šarže a kontrolné údaje výrobcu o kvalite/presnosti (citlivosť a špecifickosť protilátky a limit detekcie) pre súpravu ELISA,
- informácie o príprave a aplikácii testovanej látky,
- zdôvodnenie výberu dávky (vrátane výsledkov z predbežného skríningového testu, ak sa uskutočnil),
- použité koncentrácie nosiča a testovanej látky a celkové množstvo aplikovanej testovanej látky,
- údaje o kvalite krmiva a vody (vrátane druhu/zdroja krmiva, zdroja vody),
- podrobný opis harmonogramu podávania dávok a odberu vzoriek,
- metódy merania toxicity,

- kritériá na hodnotenie štúdií ako pozitívnych alebo negatívnych,
- informácie o akýchkoľvek odchýlkach od protokolu a vysvetlenie, ako odchýlky ovplyvňujú návrh a výsledky štúdie.

Kontrola spoľahlivosti:

- súhrn výsledkov poslednej kontroly spoľahlivosti vrátane informácií o testovanej látke, koncentrácii a použitom nosiči,
- súbežné a/alebo historické kontrolné údaje o pozitívnej a súbežnej negatívnej kontrole (s rozpúšťadlom/nosičom) pre testovacie laboratórium,
- ak nebola zahrnutá súbežná pozitívna kontrola, dátum a laboratórna správa o najaktuálnejšej periodickej pozitívnej kontrole a správa s historickými údajmi o pozitívnej kontrole, ktorými laboratórium zdôvodňuje nevykonanie súbežnej pozitívnej kontroly.

Výsledky:

- hmotnosti jednotlivých myší na začiatku podávania dávky a pri naplánovanom humánnom usmrtení, ako aj priemerný a súvisiaci rozsah chyby (napr. SD a SEM) pre každú pokusnú skupinu,
- časový priebeh nástupu príznakov toxicity u každého zvieraťa vrátane podráždenia kože v mieste podania látky, ak sa vyskytnú,
- tabuľka indexov označenia BrdU u jednotlivých myší a hodnoty SI v každej pokusnej skupine,
- priemerný a súvisiaci rozsah chyby (napr. SD, SEM) v súvislosti s indexom označenia BrdU/myš v každej pokusnej skupine a výsledky analýzy extrémnej hodnoty v každej pokusnej skupine,
- výpočet SI a vhodné opatrenie variability, ktoré berie do úvahy variabilitu medzi zvieratami v skupinách, ktorým sa podáva testovaná látka, a v kontrolných skupinách,
- vzťah medzi dávkou a odozvou,
- v prípade potreby štatistické analýzy.

Rozbor výsledkov:

- stručný komentár v súvislosti s výsledkami, analýza odozvy na dávku, štatistické analýzy, ak existujú, s uvedením záveru, či by sa testovaná látka mala považovať za látku spôsobujúcu senzibilizáciu kože.

LITERATÚRA

1. OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
2. Chamberlain, M. and Basketter, D. A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999 – 1002.
3. Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Kimber, I. and Loveless, S. E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985 – 997.
4. Basketter, D. A., Gerberick, G. F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327 – 333.
5. Van Och, F. M. M., Slob, W., De Jong, W. H., Vandebriel, R. J. and 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, 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 Publication No 99-4494. Research Triangle Park, N.C. K dispozícii na stránke: [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), 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), 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), 249 – 257.
10. ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozícii na stránke: [<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. K dispozícii na stránke: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPrept2009.pdf].
12. Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and 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, 129 – 134.
13. OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
14. Kreiling, R., Hollnagel, H. M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M. S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and 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, 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. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90 – 96.
16. ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
17. ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozícii na stránke: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf].
18. McGarry, H. F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71 – 89.
19. Kimber, I., Dearman, R. J., Scholes E. W. and Basketter, D. A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13 – 31.
20. OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
21. Reeder, M. K., Broomhead, Y. L., DiDonato, L., and DeGeorge, G. L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 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. K dispozícii na stránke: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fdLLNA/BRDcomplete.pdf>].

23. Hayes, B. B., Gerber, P. C., Griffey, S. S., and Meade, B. J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug Chem. Toxicol.*, 21, 195 – 206.
24. Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H. C., Ruzicka, T., Ahr, H. J., Lehmann, P. and Vohr, V. W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83 – 94.
25. Woolhiser, M. R., Hayes, B. B., and Meade, B. J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245 – 256.
26. Hayes, B. B., and 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, 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., and Vohr, H. W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60 – 68.
28. Vohr, H. W. and Ahr, H. J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721 – 728.
29. Patterson, R. M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by *Pfiesteria* extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 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. K dispozícii na stránke: [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, Paris. K dispozícii na stránke: [<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., and 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, 563 – 579.
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, Paris. K dispozícii na stránke: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].

DODATOK 1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: Miera zhody výsledkov testovacej metódy s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o opatrenie výkonnosti testovacej metódy a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa ako synonymum s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (33).

Referenčná látka: Látka spôsobujúca alebo nespôsobujúca senzibilizáciu, ktorá sa používa ako štandardná látka na porovnanie s testovanou látkou. Referenčná látka by mala mať tieto vlastnosti: i) konzistentný(-é) a spoľahlivý(-é) zdroj(-e); ii) štrukturálnu a funkčnú podobnosť s triedou látok, ktoré sa budú testovať; iii) známe fyzikálno-chemické vlastnosti; iv) podporné údaje o známych účinkoch a v) známu potenciú v rozsahu želaného odzvy.

Falošný negatívny výsledok: Testovaná látka je testovanou metódou nesprávne identifikovaná ako negatívna alebo neaktívna, pričom v skutočnosti je pozitívna alebo aktívna (33).

Falošný pozitívny výsledok: Testovaná látka je testom nesprávne identifikovaná ako pozitívna alebo aktívna, pričom v skutočnosti je negatívna alebo neaktívna (33).

Nebezpečnosť: Potenciál škodlivého účinku na zdravie alebo životné prostredie. Škodlivý účinok sa prejavuje až pri dostatočnej hladine expozície.

Medzilaboratórna reprodukovateľnosť: Miera, do akej rôzne kvalifikované laboratóriá, ktoré používajú rovnaký protokol a testujú rovnaké testovacie látky, dokážu dosiahnuť kvalitatívne a kvantitatívne podobné výsledky. Medzilaboratórna reprodukovateľnosť sa určuje počas postupov pred validáciou a v rámci postupov validácie a znamená mieru, do akej možno test úspešne prenášať medzi laboratóriami. Takisto je známa ako reprodukovateľnosť medzi laboratóriami (33).

Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť: Určenie miery, do akej kvalifikovaní pracovníci v rámci jedného laboratória dokážu úspešne opakovať výsledky s použitím konkrétneho protokolu v rôznom čase. Takisto je známa ako reprodukovateľnosť v rámci laboratória (33).

Extrémna hodnota: Extrémna hodnota je pozorovanie, ktoré je značne odlišné od ostatných hodnôt v náhodnej vzorke z populácie.

Zabezpečovanie kvality: Riadiaci proces, v ktorom jednotlivci nezávislí od osôb vykonávajúcich testy posudzujú súlad s laboratórnymi testovacími normami, požiadavkami a postupmi vedenia záznamov, ako aj presnosť prenosu údajov.

Spôľahlivosť: Meria rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda počas istého časového obdobia opakovane vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti (33).

Senzibilizácia kože: Imunologický proces, ku ktorému dochádza po lokálnom vystavení náchylného jednotlivca chemickému alergénu, ktorý vyvoláva kožnú imunitnú odozvu, ktorá môže viesť k vzniku kontaktnej senzibilizácie.

Stimulačný index (SI): Hodnota vypočítaná na posúdenie potenciálu testovanej látky spôsobiť senzibilizáciu kože; ide teda o pomer proliferácie v pokusných skupinách a proliferácie v súbežných kontrolných skupinách, ktorým sa podáva nosič.

Testovaná látka (tiež sa nazýva *testovaná chemikália*): Akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.“
