

II

(Nezakonodajni akti)

UREDBE

UREDBA KOMISIJE (EU) št. 640/2012

z dne 6. julija 2012

o spremembi Uredbe (ES) št. 440/2008 o določitvi preskusnih metod v skladu z Uredbo (ES) št. 1907/2006 Evropskega parlamenta in Sveta o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH) zaradi njene prilagoditve tehničnemu napredku

(Besedilo velja za EGP)

EVROPSKA KOMISIJA JE –

ob upoštevanju Pogodbe o delovanju Evropske unije,

in Sveta z dne 22. septembra 2010 o zaščiti živali, ki se uporabljajo v znanstvene namene ⁽³⁾ in Direktivo Sveta 86/609/EGS z dne 24. novembra 1986 o približevanju zakonov in drugih predpisov držav članic o varstvu živali, ki se uporabljajo za poskusne in druge znanstvene namene ⁽⁴⁾. Posvetovanja z zainteresiranimi stranmi o tem predlogu so bila opravljena.

ob upoštevanju Uredbe (ES) št. 1907/2006 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 18. decembra 2006 o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH) ter o ustanovitvi Evropske agencije za kemikalije in o spremembi Direktive 1999/45/ES ter o razveljavitvi Uredbe Sveta (EGS) št. 793/93 in Uredbe Komisije (ES) št. 1488/94 ter Direktive Sveta 76/769/EGS in direktiv Komisije 91/155/EGS, 93/67/EGS, 93/105/ES in 2000/21/ES ⁽¹⁾, ter zlasti člena 13(3) Uredbe,

(3) Uredbo Sveta (ES) št. 440/2008 je zato treba ustrezno spremeniti.

(4) Ukrepi iz te uredbe so v skladu z mnenjem odbora, ustanovljenega v skladu s členom 133 Uredbe (ES) št. 1907/2006 –

ob upoštevanju naslednjega:

SPREJELA NASLEDNJO UREDBO:

(1) Uredba Komisije (ES) št. 440/2008 ⁽²⁾ vsebuje preskusne metode za ugotavljanje fizikalno-kemijskih lastnosti, toksičnosti in ekotoksičnosti snovi, ki jih je treba uporabiti za namene Uredbe (ES) št. 1907/2006.

Člen 1

Priloga k Uredbi (ES) št. 440/2008 se spremeni v skladu s Prilogo k tej uredbi.

(2) Uredbo (ES) št. 440/2008 je treba posodobiti tako, da se vanjo prednostno vključijo nove in posodobljene alternativne preskusne metode, ki jih je pred kratkim sprejel OECD, da se število živali za poskusne namene zmanjša v skladu z Direktivo 2010/63/EU Evropskega parlamenta

Člen 2

Ta uredba začne veljati tretji dan po objavi v *Uradnem listu Evropske unije*.

⁽¹⁾ UL L 396, 30.12.2006, str. 1.

⁽²⁾ UL L 142, 31.5.2008, str. 1.

⁽³⁾ UL L 276, 20.10.2010, str. 33.

⁽⁴⁾ UL L 358, 18.12.1986, str. 1.

Ta uredba je v celoti zavezujoča in se neposredno uporablja v vseh državah članicah.

V Bruslju, 6. julija 2012

Za Komisijo
Predsednik
José MANUEL BARROSO

PRILOGA

Priloga k Uredbi (ES) št. 440/2008 se spremeni:

1. Poglavlje B.42 se nadomesti z naslednjim:

„B.42. PREOČUTLJIVOST KOŽE: LOKALNA ANALIZA BEZGAVK

UVOD

1. Smernice OECD za preskušanje kemikalij in preskusne metode EU, ki temeljijo na teh smernicah, se redno preverjajo zaradi znanstvenega napredka, spreminjajočih se zakonodajnih potreb in vprašanj, povezanih z dobrim počutjem živali. Prvotna preskusna metoda za določanje preobčutljivosti kože pri miših, lokalna analiza bezgavk (LLNA; Smernica za preskušanje OECD 429; poglavje B.42 te priloge) je bila sprejeta že prej (1). Objavljene so podrobnosti o validaciji LLNA in pregled s tem povezanega dela (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Posodobljena LLNA temelji na oceni izkušenj in znanstvenih podatkih (12). To je druga preskusna metoda, zasnovana za ocenjevanje morebitne preobčutljivosti kože s kemikalijami (snovmi in zmesmi) pri živalih. Druga preskusna metoda (tj. Smernica za preskušanje OECD 406; poglavje B.6 te priloge) pa uporablja preskuse na morskih prašičkih, predvsem maksimizacijski in Buehlerjev preskus na morskih prašičkih (13). LLNA zagotavlja prednosti v primerjavi z metodo B.6 in Smernico za preskušanje OECD 406 (13) glede dobrega počutja živali. Ta posodobljena preskusna metoda za LLNA vključuje skupino standardov učinkovitosti (Dodatek 1), ki se lahko uporabijo za oceno statusa validacije novih in/ali spremenjenih preskusnih metod, ki so v fukcijskem in mehaničnem smislu podobne LLNA, v skladu z načeli smernic OECD št. 34 (14).
2. LLNA preučuje indukcijsko fazo preobčutljivosti kože in zagotavlja količinske podatke, ki so primerni za oceno odziva na odmerek. Treba je opozoriti, da so blagi/zmerni povzročitelji preobčutljivosti, ki se priporočajo kot ustrezne kemikalije pozitivne kontrole za preskusne metode z morskimi prašički (tj. B.6; Smernica za preskušanje OECD 406), (13) primerni tudi za uporabo pri LLNA (6) (8) (15). Pristop omejene LLNA (rLLNA), pri katerem bi se lahko uporabilo do 40 % manj živali, je prav tako opisan kot možnost v tej preskusni metodi (16) (17) (18). rLLNA se lahko uporabi, kadar obstaja zakonodajna potreba po potrditvi negativne napovedi o morebitni preobčutljivosti kože, če so izpolnjene vse druge specifikacije protokola LLNA, kot je opisano v tej preskusni metodi. Napoved negativnega rezultata bi morala temeljiti na vseh razpoložljivih informacijah, kot je opisano v odstavku 4. Pred uporabo rLLNA je treba zagotoviti jasne obrazložitve in znanstvene utemeljitve za njeno uporabo. Če je z rLLNA proti pričakovanjem pridobljen pozitiven ali dvoumen rezultat, je morda potrebno dodatno preskušanje za razlago ali pojasnitev izidov. rLLNA se ne sme uporabljati za ugotavljanje nevarnosti preskusnih snovi, ki povzročajo preobčutljivost kože, kadar so potrebne informacije o odzivu na odmerek, kot npr. podrazvrstitvev za Uredbo (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi in Globalno usklajen sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij Združenih narodov.

OPREDELITVE POJMOV

3. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 2.

IZHODIŠČA IN OMEJITVE

4. LLNA je nadomestna metoda za ugotavljanje morebitne preobčutljivosti kože s kemikalijami. To ne pomeni nujno, da je treba v vseh primerih namesto preskusov na morskih prašičkih uporabiti LLNA (tj. B.6; Smernica za preskušanje OECD 406) (13), temveč da je ta analiza enako dobra in se lahko uporabi kot druga možnost, pri kateri navadno niso več potrebne dodatne potrditve pozitivnih in negativnih rezultatov. Preskuševalni laboratorij mora pred začetkom študije preučiti vse razpoložljive informacije o preskusni snovi. Takšne informacije bodo vključevale vrsto in kemijsko sestavo preskusne snovi; njene fizikalno-kemijske lastnosti; rezultate katerih koli drugih preskusov toksičnosti na preskusni snovi, *in vitro* ali *in vivo*; in toksikološke podatke o strukturno sorodnih kemikalijah. Te informacije je treba preučiti, da se določi, ali je LLNA primerna za snov (glede na nezdružljivost omejenega števila vrst kemikalij pri LLNA – glej odstavke 5), in za lažjo izbiro odmerka.
5. LLNA je metoda *in vivo* in posledično ne odpravlja uporabe živali pri ocenjevanju delovanja, ki povzročajo alergijsko preobčutljivost ob stiku. Vendar ima možnost, da zmanjša število živali, potrebnih v ta namen. Še več, LLNA ponuja znatno izboljšanje (manj bolečine in trpljenja) načina, kako se živali uporabljajo za preskušanje alergijske preobčutljivosti ob stiku. LLNA temelji na upoštevanju imunoloških primerov, ki jih spodbudijo kemikalije med indukcijsko fazo preobčutljivosti. V nasprotju s preskusi na morskih prašičkih (tj. B.6; Smernica za preskušanje OECD (406) (13) LLNA ne zahteva, da se povzročijo izzvane reakcije prekomerne občutljivosti kože. Poleg tega LLNA ne zahteva uporabe pomožnega preskusa (13) kot pri maksimizacijskem preskusu na morskih prašičkih. S tem LLNA zmanjšuje bolečino in trpljenje živali. Kljub prednostim LLNA v primerjavi z metodo B.6 in Smernico za preskušanje OECD 406 je treba upoštevati, da obstajajo nekatere omejitve, zaradi katerih je lahko nujna uporaba metode B.6 ali Smernice za preskušanje OECD 406 (13) (npr. lažni negativni izidi pri LLNA pri nekaterih kovinah, lažni pozitivni izidi pri nekaterih dražilnih snoveh za kožo [kot so nekatere vrste površinsko razgradljivih kemikalij] (19) (20), ali topnost preskusne snovi). Poleg tega je zaradi kemijskih razredov ali snovi s funkcionalnimi skupinami, za katere se je izkazalo, da lahko delujejo kot moteči dejavniki (21) lahko potrebna

uporaba preskusov na morskih prašičkih (tj. B.6; Smernica za preskušanje OECD 406) (13). Na podlagi omejene podatkovne zbirke za validacijo, ki je obsegala zlasti pesticidne pripravke, je bolj verjetno, da bo za te vrste snovi pozitiven rezultat prinesla LLNA kot pa preskus na morskih prašičkih (22). Vendar pa bi se lahko pri preskušanju pripravkov preučila tudi možnost vključitve podobnih snovi z znanimi rezultati kot primerjalnih snovi, s čimer bi se dokazalo, da LLNA deluje pravilno (glej odstavek 16). Razen takšnih opredeljenih omejitev bi morala biti LLNA primerna za preskušanje katere koli snovi, razen če so s temi snovmi povezane lastnosti, ki lahko ovirajo natančnost LLNA.

NAČELO PRESKUSA

6. Osnovno načelo, na katerem temelji LLNA, je, da povzročitelji preobčutljivosti povzročijo množenje limfocitov v bezgavkah, ki drenirajo območje nanosa preskusne snovi. To množenje je sorazmerno z odmerkom in močjo uporabljenega alergena in je preprosto sredstvo za pridobitev količinske izmere preobčutljivosti. Množenje se izmeri s primerjavo povprečnega množenja v vsaki preskusni skupini in povprečnega množenja v kontrolni skupini, tretirani z nosilcem. Preden se utemelji razvrstitev preskusne snovi kot možnega povzročitelja preobčutljivosti kože, se določi razmerje med povprečnim množenjem v vsaki tretirani skupini in povprečnim množenjem v primerjalni kontrolni skupini z nosilcem, ki se imenuje stimulacijski indeks (SI) in mora biti ≥ 3 . Tukaj opisani postopki temeljijo na uporabi *in vivo* radioaktivnih oznak za merjenje povečanega števila množečih se celic v ušesnih bezgavkah. Za oceno števila množečih se celic se lahko uporabijo tudi druge končne točke, če so zahteve standardov učinkovitosti v celoti izpolnjene (Dodatek 1).

OPIS ANALIZE

Izbira živalskih vrst

7. Izbrana vrsta za ta preskus je miš. Uporabijo se mlade odrasle miše samice seva CBA/Ca ali CBA/J, ki še niso kotile in niso breje. Na začetku študije morajo biti živali stare 8–12 tednov, odstopanje mase živali pa mora biti čim manjše in ne sme presegati 20 % povprečne mase. Namesto tega se lahko uporabijo drugi sevi in samci, če je pridobljenih dovolj podatkov za dokaz, da ne obstajajo značilne razlike v odzivu pri LLNA glede na sev in/ali spol.

Bivalni in prehranjevalni pogoji

8. Miši morajo biti skupinsko nastanjene (23), razen če je zagotovljena ustrezna znanstvena utemeljitev za njihovo ločeno nastanitev. Temperatura v prostoru za poskusne živali mora biti 22 ± 3 °C. Čeprav mora biti relativna vlažnost najmanj 30 % in po možnosti ne sme, razen med čiščenjem prostora, presegati 70 %, mora biti ciljna vlažnost, 50–60 %. Osvetlitev mora biti umetna, in sicer 12 ur svetlobe, 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska prehrana z neomejeno oskrbo s pitno vodo.

Priprava živali

9. Živali se naključno izberejo, označijo tako, da je omogočeno posamično prepoznavanje (vendar ne s katero od oblik ušesnih oznak), in zadržijo v kletkah najmanj pet dni pred začetkom dajanja odmerka, da se lahko prilagodijo laboratorijskim razmeram. Pred začetkom tretiranja se vse živali pregledajo, da se zagotovi, da nimajo opaznih kožnih lezij.

Priprava preskusnih raztopin

10. Trdne kemikalije se pred nanosom na uho miši raztopijo ali suspendirajo v ustreznih topilih ali nosilcih in po potrebi razredčijo. Tekoče kemikalije se lahko nanesejo nerazredčene ali pa se razredčijo pred dajanjem odmerka. Pri netopnih kemikalijah, kot so tiste, ki se običajno uporabljajo v medicinskih pripomočkih, je treba uporabiti močno povečano ekstrakcijo v ustreznem topilu, da se odkrijejo vse ekstraktibilne sestavine za preskušanje pred nanosom na uho miši. Preskusne snovi je treba pripravljati dnevno, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

Preverjanje zanesljivosti

11. Za prikaz ustrezne učinkovitosti analize se uporabijo kemikalije pozitivne kontrole, ki se odzovejo z ustrezno in ponovljivo občutljivostjo kot preskusna snov, ki povzroča preobčutljivost, za katero je stopnja reakcije natančno opredeljena. Uporaba primerjalne pozitivne kontrole je priporočena, saj pokaže zmožnost laboratorija, da uspešno izvede vsako analizo, ter omogoča ocenjevanje ponovljivosti in primerljivosti v enem ali več laboratorijih. Tudi nekateri regulativni organi zahtevajo uporabo pozitivne kontrole pri vsaki raziskavi, zato se uporabnikom priporoča, da se pred izvedbo LLNA posvetujejo s pristojnimi organi. V skladu s tem se priporoča redna uporaba primerjalne pozitivne kontrole, saj tako ni potrebno dodatno preskušanje na živalih za izpolnitev zahtev, ki se lahko pojavijo zaradi uporabe redne pozitivne kontrole (glej odstavek 12). Pozitivna kontrola mora povzročiti pozitiven odziv LLNA na raven izpostavljenosti, za katero se pričakuje, da bo dala večji stimulacijski indeks (SI)

- > 3 kot negativna kontrolna skupina. Odmerek pozitivne kontrole je treba izbrati tako, da ne povzroči čezmerne draženja kože ali sistemske toksičnosti in da je indukcija ponovljiva, vendar ne čezmerna (tj. $SI > 20$ bi bil čezmeren). Priporočena pozitivna kontrola je 25-odstotni heksil cimetov aldehyd (Služba za izmenjavo kemijskih izvlečkov [CAS] št. 101-86-0) v acetonu: olivno olje (4:1, v/v) in 5-odstotni merkaptobenzotiazol (št. CAS 149-30-4) v N,N-dimetilformamidu (glej Dodatek 1, preglednica 1). V nekaterih okoliščinah se lahko ob ustrezni utemeljitvi uporabijo druge pozitivne kontrole, ki izpolnjujejo zgornja merila.
12. Običajno je uporaba primerjalne pozitivne kontrolne skupine priporočena, lahko pa obstajajo okoliščine, v katerih redno preskušanje (tj. v razmikih ≤ 6 mesecev) pozitivne kontrole morda zadošča za laboratorije, ki redno izvajajo LLNA (tj. izvajajo LLNA vsaj enkrat mesečno) in imajo vzpostavljene zbirke podatkov o preteklih pozitivnih kontrolah, ki dokazujejo zmožnost laboratorija, da pridobi ponovljive in natančne rezultate s pozitivnimi kontrolami. Ustrezna strokovnost pri izvajanju LLNA se lahko uspešno dokaže z dobivanjem doslednih pozitivnih rezultatov pri pozitivni kontroli pri vsaj desetih neodvisnih preskusih, izvedenih v razumnem časovnem obdobju (tj. v manj kot enem letu).
13. Primerjalno pozitivno kontrolno skupino je treba vključiti vedno, kadar pride do postopkovne spremembe pri LLNA (tj. zamenjava usposobljenega osebja, zamenjava materiala za preskusno metodo in/ali reagentov, zamenjava opreme za preskusno metodo, zamenjava vira preskusnih živali), takšne spremembe pa je treba vedno zabeležiti v laboratorijskih poročilih. Pri odločanju o nujnosti vzpostavitve nove zbirke preteklih podatkov za beleženje doslednosti pri rezultatih pozitivne kontrole je treba upoštevati učinek, ki ga imajo te spremembe na ustreznost predhodno vzpostavljene zbirke preteklih podatkov.
14. Raziskovalci se morajo zavedati, da odločitev o izvajanju redne namesto primerjalne pozitivne kontrolne študije vpliva na ustreznost in sprejemljivost negativnih rezultatov študije, pridobljenih brez primerjalne pozitivne kontrole v razmiku med rednimi pozitivnimi kontrolnimi študijami. Na primer, če je rezultat, pridobljen z redno pozitivno kontrolno študijo, lažno negativen, so lahko vprašljivi negativni rezultati preskusne snovi, pridobljeni v času med zadnjo sprejemljivo redno pozitivno kontrolno študijo in nesprejemljivo redno pozitivno kontrolno študijo. Pri odločanju, ali vključiti primerjalne pozitivne kontrole ali izvajati samo redne pozitivne kontrole, je treba skrbno preučiti posledice teh rezultatov. Treba je razmisliti tudi o uporabi manjšega števila živali v primerjalni pozitivni kontrolni skupini, če je to znanstveno utemeljeno in če laboratorij na podlagi preteklih podatkov, značilnih za laboratorij, dokaže, da se lahko uporabi manjše število miši (12).
15. Čeprav je treba pozitivno kontrolo preskusiti v nosilcu, za katerega je znano, da povzroča dosleden odziv (npr. aceton: olivno olje; 4:1, v/v), lahko obstajajo nekatere zakonodajne okoliščine, ko je potrebno tudi preskušanje v nestandardnem nosilcu (klinično/kemično ustrezne sestave) (24). Če se primerjalna pozitivna kontrola preskuša v drugem nosilcu kot preskusna snov, je treba za primerjalno pozitivno kontrolo vključiti ločen kontrolni nosilec.
16. V primerih, kjer se ocenjujejo preskusne snovi za poseben kemijski razred ali razpon reakcij, so lahko primerjalne snovi uporabne tudi za dokaz, da preskusna metoda deluje pravilno za odkrivanje morebitne preobčutljivosti kože pri teh vrstah preskusnih snovi. Ustrezne primerjalne snovi morajo imeti naslednje lastnosti:
- strukturno in funkcijsko podobnost z razredom preskusne snovi, ki se preskuša,
 - znane fizikalne/kemijske lastnosti,
 - podporne podatke iz LLNA,
 - podporne podatke od drugih živalskih modelov in/ali ljudi.

PRESKUSNI POSTOPEK

Število živali in velikost odmerkov

17. Na skupino odmerka se uporabijo najmanj štiri živali z najmanj tremi koncentracijami preskusne snovi, poleg tega pa še primerjalna negativna kontrolna skupina, tretirana zgolj z nosilcem za preskusno snov, in pozitivna kontrola (primerjalna ali izvedena pred kratkim, odvisno od politike laboratorija pri upoštevanju odstavkov 11–15). Treba je razmisliti o preskušanju več odmerkov pozitivne kontrole, zlasti če se pozitivna kontrola preskuša občasno. Živali v kontrolnih skupinah je treba, razen če se ne tretirajo s preskusno snovjo, obravnavati in tretirati na enak način kot živali v tretiranih skupinah.

18. Izbira odmerka in nosilca mora temeljiti na priporočilih iz sklica (3) in (5). Zaporedni odmerki se običajno izberejo iz ustrezne serije koncentracij, kot so 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % itd. Izbira uporabljene serije koncentracij mora biti ustrezno znanstveno utemeljena. Kadar so na voljo, je treba pri izbiri treh zaporednih koncentracij upoštevati vse obstoječe toksikološke informacije (npr. akutno toksičnost in draženje kože) ter strukturne in fizikalno-kemijske informacije o želeni preskusni snovi (in/ali strukturno povezani snovi), tako da je pri največji koncentraciji izpostavljenost največja, hkrati pa ni sistemске toksičnosti in/ali čezmernega draženja kože (3) (25). Če takšne informacije niso na voljo, je morda najprej potreben predhodni presejalni preskus (glej odstavke 21–24).
19. Nosilec ne sme ovirati rezultatov preskusa ali vplivati nanje, izbere pa se na podlagi povečevanja topnosti, da se med pripravljanjem raztopine/suspenzije, ki je primerna za uporabo preskusne snovi, pridobi največjo možno koncentracijo. Priporočljivi nosilci so aceton: olivno olje (4:1, v/v), N,N-dimetilformamid, metil etil keton, propilen glikol in dimetil sulfoksid (19), vendar se lahko uporabljajo tudi drugi, če je zagotovljena ustrezna znanstvena utemeljitev. V nekaterih okoliščinah je morda treba kot dodatno kontrolo uporabiti klinično ustrezno topilo ali trgovsko sestavo, v kateri se trži preskusna snov. Paziti je treba zlasti, da so v nosilni sistem vključene hidrofilne preskusne snovi, ki vlažijo kožo in se ne izsušijo takoj, z vključitvijo ustreznih pospeševalcev raztapljanja (npr. 1-odstotnim Pluronic® L92). Zato se je treba izogibati povsem vodnim nosilcem.
20. Obdelava bezgavk posamezne miši omogoča oceno spremenljivosti med posameznimi živalmi ter statistično primerjavo razlik med meritvami preskusne snovi in primerjalne kontrolne skupine z nosilcem (glej odstavke 35). Poleg tega je ocena možnosti zmanjšanja števila miši v pozitivni kontrolni skupini izvedljiva samo, če se zbirajo podatki o posameznih živalih (12) spodaj. Poleg tega nekateri regulativni organi zahtevajo zbiranje podatkov o posameznih živalih. Kljub temu lahko nekateri regulativni organi skupne podatke o živalih štejejo za sprejemljive; v takih primerih imajo lahko uporabniki možnost, da zbirajo podatke o posameznih živalih ali skupne podatke.

Predhodni presejalni preskus

21. Če informacije za določitev največjega odmerka za preskušanje niso na voljo (glej odstavek 18 zgoraj), je treba izvesti predhodni presejalni preskus, da se določi ustrezna velikost odmerka za preskušanje z LLNA. Namen predhodnega presejalnega preskusa je zagotoviti smernice za izbiro največje velikosti odmerka za uporabo v glavni študiji LLNA v primerih, ko niso na voljo informacije o koncentraciji, ki povzroči sistemsko toksičnost (glej odstavek 24) in/ali čezmerno draženje kože (glej odstavek 23). Največja velikost odmerka je 100-odstotna preskusna snov za tekočine ali najvišja možna koncentracija za trdne snovi ali suspenzije.
22. Predhodni presejalni preskus se izvede v pogojih, ki so enaki tistim v glavni študiji LLNA, s to razliko, da se ne izvede ocena množenja v bezgavkah in da se lahko uporabi manj živali na skupino odmerka. Predlaga se uporaba ene ali dveh živali na skupino odmerka. Vse miši se opazuje dnevno glede kliničnih znakov sistemске toksičnosti ali lokalnega draženja na mestu nanosa. Telesna masa se zabeleži pred preskusom in pred usmrtnitvijo (6. dan). Obe ušesi vsake miši se opazuje glede rdečine in oceni s pomočjo preglednice 1 (25). Meritve debeline ušesa se izvedejo z napravo za merjenje debeline (npr. digitalnim mikrometrom ali merilnikom debeline s številčnico) 1. dan (pred odmerkom), 3. dan (približno 48 ur pred prvim odmerkom) in 6. dan. Poleg tega se lahko 6. dan debelino ušesa določi s preluknjanjem ušesa za določitev mase, ki se izvede po humani usmrtnitvi živali. Znak za čezmerno draženje kože je rdečina z oceno ≥ 3 in/ali povečana debelina ušesa za ≥ 25 % na kateri koli dan merjenja (26) (27). Največji odmerek, izbran za glavno študijo LLNA, je naslednji nižji odmerek v seriji koncentracij iz predhodnega presejalnega preskusa (glej odstavek 18), ki ne povzroči sistemске toksičnosti in/ali čezmernega draženja kože.

Preglednica 1

Ocena rdečine

Ugotovitev	Ocena
Rdečine ni	0
Neznatna rdečina (komajda opazna)	1
Zelo razločna rdečina	2
Zmerna do močna rdečina	3
Močna rdečina (rdečina rdeče pese) in nastanek krast ovirata razvrstitev rdečine	4

23. Poleg 25-odstotnega povečanja debeline ušesa (26) (27) se za opredelitev dražilnih snovi pri LLNA uporablja tudi statistično značilno povečanje debeline ušesa tretirane miši v primerjavi s kontrolno mišjo (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Ker pa se lahko statistično značilno povečanje pojavi tudi pri debelini ušesa, manjši od 25 %, ni izrecno povezano s čezmernim draženjem (30) (32) (33) (34).
24. Naslednje klinične ugotovitve lahko nakazujejo sistemsko toksičnost (35) (36), kadar se uporabljajo kot del celovite ocene, in zato lahko pokažejo največjo velikost odmerka za uporabo v glavni LLNA: spremembe v delovanju živčnega sistema (npr. piloerekcija, ataksija, tremorji in krči); vedenjske spremembe (npr. agresivnost, spremembe glede nege, opazna sprememba stopnje aktivnosti); spremembe dihanja (npr. spremembe frekvence in intenzivnosti dihanja, kot so dispneja, zasoplost in hropenje) ter spremembe glede uživanja hrane in vode. Poleg tega je treba pri oceni upoštevati znake letargije in/ali neodzivnosti ter morebitne klinične znake bolečine in trpljenja, ki niso samo blagi ali trenutni, ali zmanjšanje telesne mase za > 5 % od 1. do 6. dne ter smrtnost. Umirajoče živali ali živali, ki očitno trpijo ali kažejo znake hudega in dolgotrajnega trpljenja, se usmrtijo na human način (37).

Načrt za poskus glavne študije

25. Načrt za poskus analize je naslednji:

- 1. dan: Posamično ugotovljena in zabeležena masa vsake živali in morebitne klinične ugotovitve. Nanos 25 µl ustrezno razredčene preskusne snovi, samega nosilca ali pozitivne kontrole (primerjalne ali izvedene pred kratkim, odvisno od politike laboratorija pri upoštevanju odstavkov 11–15).
- 2. in 3. dan: Ponovi se postopek nanosa, ki je bil izveden 1. dan.
- 4. in 5. dan: Brez tretiranja.
- 6. dan: Zabeleži se masa vsake živali. Vsem poskusnim in kontrolnim mišim se v repno žilo vbrizga 250 µl sterilnega fosfatnega pufru s soljo (PBS), ki vsebuje 20 µCi ($7,4 \times 10^5$ Bq) tritiranega (^3H)-metil timidina. Lahko pa se vsem mišim v repno veno vbrizga 250 µl PBS, ki vsebuje 2 µCi ($7,4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I -jododeoksiuridina in 10^{-5} M fluorodeoksiuridina. Pet (5) ur kasneje so živali humano usmrčene. Ušesne bezgavke ob vsakem ušesu miši se izrežejo in shranijo v PBS za vsako žival (pristop po posamezni živali); lahko pa se bezgavke iz vsakega ušesa izrežejo in shranijo v PBS za vsako tretirano skupino (zbirni pristop za tretirane skupine). Podatki in diagrami o identifikaciji in izrezu bezgavk so na voljo v sklicu (12). Za nadaljnje spremljanje lokalnega odziva kože v glavni študiji se lahko v protokol študije vključijo dodatni parametri, kot so ocena rdečine ušesa ali meritve debeline ušesa (pridobljene z merilnikom debeline ali preluknjanjem ušes za določitev mase pri obdukciji).

Priprava celičnih suspenzij

26. Enotna celična suspenzija iz celic izrezanih bezgavk, bodisi bilateralno iz posameznih živali bodisi zbirno iz tretiranih skupin, se pripravi z blago mehanično disagregacijo skozi žično mrežo iz nerjavnega jekla z velikostjo odprtin 200 mikronov ali drugo uveljavljeno tehniko za pripravo enotne celične suspenzije. Celice iz bezgavk se dvakrat izperejo s presežkom fosfatnega pufru s soljo in DNA se 18 ur obarja s 5-odstotno trikloroacetno kislino pri 4 °C (3). Peleti se ponovno suspendirajo v 1 ml trikloroacetne kisline in prenesejo v scintilacijske stekleničke, ki vsebujejo 10 ml scintilacijske tekočine, za štetje ^3H , ali pa prenesejo neposredno v epruvete za gama štetje za ^{125}I .

Določitev množenja celic (vključena radioaktivnost)

27. Vključitev ^3H -metil timidina se izmeri z β -scintilacijskim štetjem razgradenj na minuto (DPM). Vključitev ^{125}I -jododeoksiuridina se izmeri s štetjem ^{125}I in se prav tako izrazi kot DPM. Odvisno od uporabljenega pristopa se vključitev izrazi kot DPM/miš (posamični pristop) ali DPM/tretirano skupino (zbirni pristop za tretirane skupine).

Omejena LLNA

28. V določenih primerih, ko obstaja zakonodajna potreba po potrditvi negativne napovedi preobčutljivosti kože, se lahko uporabi neobvezni protokol rLLNA (16) (17) (18) z manjšim številom živali, če so izpolnjene vse druge specifikacije protokola rLLNA v tej preskusni metodi. Pred uporabo rLLNA je treba zagotoviti jasne obrazložitve in znanstvene utemeljitve za njeno uporabo. Če je pridobljen pozitiven ali dvoumen rezultat, je morda potrebno dodatno preskušanje za razlago ali pojasnitev izida.

29. Edina razlika med protokoli preskusne metode LLNA in rLLNA je manjše število skupin odmerka, zaradi česar rLLNA ne zagotavlja informacij o odzivu na odmere. Zato se, kadar so potrebne informacije o odzivu na odmere, rLLNA ne uporablja. Tako kot pri LLNA z več odmerki mora biti koncentracija preskusne snovi, ki se ocenjuje pri rLLNA, najvišja koncentracija, ki pri miši ne povzroči očitne sistemske toksičnosti in/ali čezmernega draženja kože (glej odstavek 18).

OPAZOVANJA

Klinična opazovanja

30. Vsako miš je treba vsaj enkrat dnevno natančno opazovati glede kliničnih znakov, lokalnega draženja na mestu nanosa ali sistemske toksičnosti. Vsa opazovanja se sistematično zabeležijo v evidence, ki se vodijo za vsako miš. Načrti spremljanja morajo vključevati merila za hitro identifikacijo miši, ki izražajo sistemsko toksičnost, čezmerno draženje kože ali jedkost za kožo zaradi evtanazije (37).

Telesna masa

31. Kot je navedeno v odstavku 25, se telesna masa posameznih živali izmeri na začetku preskusa in ob predvideni humani usmrtitvi.

IZRAČUN REZULTATOV

32. Rezultati za vsako tretirano skupino so izraženi kot stimulacijski indeks (SI). Kadar se uporabi pristop po posamezni živali, se SI dobi tako, da se povprečno število razgradenj na minuto/miš v vsaki skupini preskusne snovi in v pozitivni kontrolni skupini deli s povprečnim številom razgradenj na minuto/miš za kontrolno skupino s topilom/nosilcem. Povprečni SI za kontrolne skupine z nosilcem je potem 1. Kadar se uporabi zbirni pristop za tretirane skupine, se SI dobi tako, da se zbirna radioaktivna vključitev za vsako tretirano skupino z vključitvijo zbirne kontrolne skupine deli z nosilcem, kar da povprečni SI.
33. Pri postopku odločanja se rezultat šteje za pozitivnega, ko je $SI \geq 3$. Vendar se lahko pri odločanju, ali je mejni rezultat pozitiven, uporabijo tudi moč odziva na odmere, statistični pomen ter doslednost odzivov v topilu/nosilcu in pozitivni kontroli (4) (5) (6).
34. Če je treba razjasniti dobljene rezultate, je treba upoštevati različne lastnosti preskusne snovi, tudi strukturno podobnost z znanimi povzročitelji preobčutljivosti, če povzroča čezmerno lokalno draženje kože pri miši, in naravo opaženega odnosa med odmerkom in odzivom. Ti in drugi razlogi so podrobno obravnavani drugje (7).
35. Zbiranje podatkov o radioaktivnosti na ravni posamezne miši bo omogočilo statistično analizo prisotnosti in stopnje odnosa med odmerkom in odzivom v podatkih. Morebitna statistična ocena lahko vključuje oceno odnosa med odmerkom in odzivom ter ustrezno prilagojene primerjave preskusnih skupin (npr. skupina, ki je prejela odmere v parih, proti primerjavam primerjalnih kontrolnih skupin z nosilcem). Statistična analiza lahko obsega npr. linearno regresijo ali Williamsov preskus za oceno nihanj odziva na odmere in Dunnettov preskus za primerjave po parih. Pri izbiri ustrezne metode statistične analize se mora raziskovalec zavedati možnih neenakosti varianc in drugih sorodnih problemov, zaradi katerih je lahko nujna pretvorba podatkov ali neparametriška statistična analiza. V vsakem primeru bo moral raziskovalec morda izvesti izračune SI ter statistične analize s podatkovnimi točkami (včasih imenovanimi „izločitve“) in brez njih.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

36. Podatki se povzamejo v obliki preglednice. Pri uporabi pristopa po posamezni živali se prikažejo vrednosti DPM za posamezno žival, skupinsko povprečje DPM/žival, s tem povezane napake (npr. SD, SEM) in povprečni SI za vsako skupino odmerka v primerjavi s primerjalno kontrolno skupino z nosilcem. Pri uporabi zbirnega pristopa za tretirane skupine se prikažeta povprečna/srednja DPM in povprečni SI za vsako skupino odmerka v primerjavi s primerjalno kontrolno skupino z nosilcem.

Poročilo o preskusu

37. Poročilo o preskusu vsebuje naslednje informacije:

preskušane in kontrolne snovi:

- identifikacijske podatke (npr. številko CAS in številko EC, če je na voljo; vir; čistost; znane nečistoče, številko serije),
- fizikalno stanje in fizikalno-kemijske lastnosti (npr. hlapnost, stabilnost, topnost),

— če je zmes, sestavo in relativne odstotke sestavin;

topilo/nosilec:

- identifikacijske podatke (čistost, po potrebi koncentracijo, uporabljeno količino),
- utemeljitev izbire uporabljenega nosilca;

preskusne živali:

- vir miši seva CBA,
- mikrobiološki status živali, če je znan,
- število in starost živali,
- vir živali, namestitvene pogoje, prehrano, itd.;

preskusni pogoji:

- podatke o pripravi in uporabi preskusne snovi,
- utemeljitev izbire odmerka (vključno z rezultati predhodnega presejalnega preskusa, če je bil izveden),
- uporabljene koncentracije nosilca in preskusne snovi ter skupno količino uporabljenih preskusnih snovi,
- podatke o kakovosti hrane in vode (vključno z vrsto/virom prehranjevanja, virom vode),
- podatke o programih tretiranja in vzorčenja,
- metode merjenja toksičnosti,
- merila za obravnavanje študij kot pozitivnih ali negativnih,
- podrobnosti o morebitnih odstopanjih protokola in pojasnilo, kako odstopanje vpliva na zasnovano študijo in njene rezultate;

preverjanje zanesljivosti:

- povzetek rezultatov zadnjega preverjanja zanesljivosti, vključno z informacijami o uporabljeni preskusni snovi, koncentraciji in nosilcu,
- primerjalne in/ali pretekle pozitivne in primerjalne negativne (topilo/nosilec) kontrolne podatke za preskuševalni laboratorij,
- če primerjalna pozitivna kontrola ni bila vključena, datum in laboratorijsko poročilo nazadnje izvedene redne pozitivne kontrole in poročilo, ki navaja pretekle pozitivne kontrolne podatke za laboratorij, na podlagi katerih je upravičeno neizvajanje primerjalne pozitivne kontrole;

rezultati:

- posamezne mase živali na začetku odmerjanja in ob predvideni usmrtnosti; ter povprečno in povezano napako (npr. SD, SEM) za vsako tretirano skupino,
- časovni potek začetka toksičnosti in njenih znakov, vključno z morebitnim draženjem kože na mestu nanosa za vsako žival,
- preglednico z vrednostmi DPM za vsako posamezno miš (pristop po posamezni živali) ali povprečnimi/srednjimi (zbirni pristop za tretirane skupine) vrednostmi DPM in vrednostmi SI za vsako tretirano skupino,

- povprečno in povezano napako (npr. SD, SPM) za DPM/miš za vsako tretirano skupino in rezultate analize izločitev za vsako tretirano skupino pri uporabi pristopa po posamezni živali,
- izračunan SI in ustrezno merilo spremenljivosti, ki pri uporabi pristopa po posamezni živali upošteva spremenljivost med posameznimi živalmi tako v preskusni snovi kot kontrolnih skupinah,
- odnos med odmerkom in odzivom,
- po potrebi, statistične analize;

razprava o rezultatih:

- kratke pripombe o rezultatih, analizo odziva na odmerek in po potrebi statistične analize, s sklepom, ali naj se preskusna snov šteje za povzročitelja preobčutljivosti kože.

VIRI

1. OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Na voljo na spletni strani: <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. Health, 53 563–79.
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, 327–33.
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. Na voljo na spletni strani: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf.
13. OECD (1992), Skin Sensitisation. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Na voljo na spletni strani: <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. Na voljo na spletni strani: <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. Na voljo na spletni strani: 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. Na voljo na spletni strani: <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. Na voljo na spletni strani: 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, na voljo na spletni strani: <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. Na voljo na spletni strani: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_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. Na voljo na spletni strani: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/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. OECD (1987), Acute Dermal Toxicity, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Na voljo na spletni strani: <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, na voljo na spletni strani: 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. Na voljo na spletni strani: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.

Dodatek 1

Standardi učinkovitosti za ocenjevanje predlaganih podobnih ali prilagojenih preskusnih metod LLNA za preobčutljivost kože

UVOD

1. Namen standardov učinkovitosti je posredovati podlago, na kateri se lahko za nove preskusne metode, lastniške (tj. avtorske, zaščitene z blagovno znamko, registrirane) in nelastniške, ugotovi, da so ustrezno natančne in zanesljive za določene namene preskušanja. Ti standardi učinkovitosti, ki temeljijo na validiranih in uveljavljenih preskusnih metodah, se lahko uporabijo za oceno zanesljivosti in natančnosti drugih podobnih metod (ki se pogovorno imenujejo 'podobni' preskusi), ki temeljijo na podobnih znanstvenih načelih in merijo ali napovedujejo isti biološki ali toksični učinek (14).
2. Spremenjene metode (tj. predlagane morebitne izboljšave odobrene preskusne metode) je treba pred sprejetjem oceniti, da se ugotovi učinek predlaganih sprememb na učinkovitost preskusa in obseg, v katerem takšne spremembe vplivajo na informacije, ki so na voljo za druge elemente postopka validacije. Odvisno od števila in narave predlaganih sprememb, dobljenih podatkov in podporne dokumentacije za te spremembe se zanje izvede enak postopek validacije, kot je predpisan za nov preskus ali, po potrebi, omejena ocena zanesljivosti in ustreznosti z uveljavljenimi standardi učinkovitosti (14).
3. Podobne ali spremenjene metode, ki so predlagane za uporabo v okviru te preskusne metode, je treba oceniti ter določiti njihovo zanesljivost in natančnost z uporabo kemikalij, ki predstavljajo celoten razpon ocen LLNA. Da bi se izognili neupravičeni uporabi živali, se priporoča, da se razvijalci modelov pred začetkom izvajanja validacijskih študij v skladu s standardi učinkovitosti in smernicami iz te preskusne metode posvetujejo z ustreznimi organi.
4. Ti standardi učinkovitosti temeljijo na ameriških ICCVAM, evropskih ECVAM in japonskih JaCVAM usklajenih standardih učinkovitosti (12) za ocenjevanje veljavnosti podobnih ali spremenjenih različic LLNA. Standardi učinkovitosti obsegajo bistvene elemente preskusne metode, priporočene referenčne kemikalije ter standarde za natančnost in zanesljivost, ki jih mora predlagana metoda doseči ali preseči.

I. Bistveni elementi preskusne metode

5. Za zagotovitev, da je podobna ali spremenjena metoda LLNA v funkcijskem in mehaničnem smislu podobna LLNA in meri isti biološki učinek, morajo biti v protokol preskusne metode vključeni naslednji elementi:

- preskusna snov se površinsko nanese na obe ušesi miši,
- množenje limfocitov se izmeri v bezgavkah, ki drenirajo območje nanosa preskusne snovi,
- množenje limfocitov se izmeri med indukcijsko fazo preobčutljivosti kože,
- pri preskusnih snoveh je največji izbran odmerek najvišja koncentracija, ki pri miši ne povzroči sistemske toksičnosti in/ali čezmernega draženja kože; pri pozitivnih referenčnih kemikalijah je največji odmerek vsaj tako velik kot vrednosti ocenjene koncentracije, potrebne za stimulacijski indeks 3 (vrednosti EC3) ustreznih referenčnih kemikalij (glej preglednico 1) pri LLNA, ne da bi pri miši povzročil sistemsko toksičnost in/ali čezmerno draženje kože,
- v vsako študijo je treba vključiti primerjalno kontrolno skupino z nosilcem, po potrebi pa se uporabi tudi primerjalna pozitivna kontrola,
- na skupino odmerka se uporabijo najmanj štiri živali,
- zberejo se podatki o posamezni živali ali skupni podatki o živalih.

Če katero od teh meril ni izpolnjeno, standardov učinkovitosti ni mogoče uporabiti za validacijo podobne ali spremenjene metode.

II. Najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij

6. Usklajeni ameriški ICCVAM, evropski ECVAM in japonski JaCVAM standardi učinkovitosti (12) določajo najkrajši možni seznam 18 referenčnih kemikalij, ki jih je treba uporabiti, in štiri druge referenčne kemikalije (tj. snovi, ki so pri LLNA dale lažne pozitivne ali lažne negativne rezultate v primerjavi z rezultati pri človeku in morskih prašičkih (B.6, ali Smernica za preskušanje OECD 406) (13) in so zato lahko enako ali bolj učinkovite od LLNA), vključene v standarde učinkovitosti za LLNA. Merila za izbor za opredelitev teh kemikalij so bila:

- seznam referenčnih kemikalij predstavlja vrste snovi, ki se običajno preskušajo glede morebitnega povzročanja preobčutljivosti kože, in razpon odzivov, ki jih LLNA lahko meri ali napove;
- kemična struktura snovi je natančno opredeljena;
- za vsako snov so na voljo podatki LLNA iz preskusov na morskih prašičkih (tj. B.6; Smernica za preskušanje OECD 406) (13) in (kadar je mogoče) ljudeh; in
- snovi so dostopne pri tržnih virih.

Priporočene referenčne kemikalije so navedene v preglednici 1. Študije, ki uporabljajo predlagane referenčne kemikalije, morajo biti ocenjene v nosilcu, s katerim so navedene v preglednici 1. V primerih, ko navedena snov ni na voljo, se lahko z ustrezno utemeljitvijo uporabijo druge snovi, ki izpolnjujejo navedena merila za izbor.

Preglednica 1

Priporočene referenčne kemikalije za standarde učinkovitosti za LLNA

Številka	Kemikalije ⁽¹⁾	Št. CAS	Oblika	Nos ⁽²⁾	EC3 % ⁽³⁾	N ⁽⁴⁾	0,5 x-2,0 x EC3	Dejanski razpon EC3	LLNA v primerjavi z MP	LLNA v primerjavi s človekom
1	5-kloro-2-metil-4-izotiazolin-3-on (CMI) in 2-metil-4-izotiazolin-3-on (MI) ⁽⁵⁾	26172-55-4/2682-20-4	tek.	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NI	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	trd.	AOO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-fenilendiamin	106-50-3	trd.	AOO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	kobaltov klorid	7646-79-9	trd.	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	izoevgenol	97-54-1	tek.	AOO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	trd.	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NI	+/+	+/+
7	citral	5392-40-5	tek.	AOO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	tek.	AOO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	evgenol	97-53-0	tek.	AOO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	fenil benzoat	93-99-2	trd.	AOO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	cimetov alkohol	104-54-1	trd.	AOO	21	1	10,5-42	NI	+/+	+/+
12	imidazolidinil urea	39236-46-9	trd.	DMF	24	1	12-48	NI	+/+	+/+
13	metil metakrilat	80-62-6	tek.	AOO	90	1	45-100	NI	+/+	+/+
14	klorobenzen	108-90-7	tek.	AOO	25	1	n.r.	n.r.	-/-	-/ (*)
15	izopropanol	67-63-0	tek.	AOO	50	1	n.r.	n.r.	-/-	-/+
16	mlečna kislina	50-21-5	tek.	DMSO	25	1	n.r.	n.r.	-/-	-/ (*)
17	metil salicilat	119-36-8	tek.	AOO	20	9	n.r.	n.r.	-/-	-/-
18	salicilna kislina	69-72-7	trd.	AOO	25	1	n.r.	n.r.	-/-	-/-

Številka	Kemikalije ⁽¹⁾	Št. CAS	Oblika	Nos ⁽²⁾	EC3 % ⁽³⁾	N ⁽⁴⁾	0,5 x–2,0 x EC3	Dejanski razpon EC3	LLNA v primerjavi z MP	LLNA v primerjavi s človekom
Druge snovi za prikaz izboljšane učinkovitosti glede na LLNA										
19	natrijev lavrilsulfat	151-21-3	trd.	DMF	8,1	5	4,05–16,2	1,5–17,1	+/-	+/-
20	etilen glikol dimetakrilat	97-90-5	tek.	MEK	28	1	14–56	NI	+/-	+/+
21	ksilen	1330-20-7	tek.	AOO	95,8	1	47,9–100	NI	+ / (**)	+/-
22	nikljev diklorid	7718-54-9	trd.	DMSO	5	2	n.r.	n.r.	-/+	-/+

Kratice: AOO = aceton olivno olje (4:1, v/v); št. CAS = številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov; DMF = N,N-dimetilformamid; DMSO = dimetil sulfoksid; DNCB = 2,4-dinitroklorobenzen; EC3 = ocenjena koncentracija, potrebna za stimulacijski indeks 3; MP = rezultat preskusa na morskih prašičkih (tj. B. 6 ali Smernica za preskušanje OECD 406) (13); HCA = heksil cimetov aldehyd; LLNA = rezultat lokalne analize bezgavk pri glodavcih (tj. B. 42 ali Smernica za preskušanje OECD 429) (1); MEK = metil etil keton; NI = ni izračunano, ker so bili podatki pridobljeni z eno samo študijo; n.r. = ni relevantno, ker je stimulacijski indeks < 3; trd. = trdna snov; Nos = nosilec preskusa.

(*) Predvideva se, da pri ljudeh ni povzročitelj preobčutljivosti, ker niso bili najdeni nobeni rezultati kliničnih epikutanih testov, zato ni vključen v komplet za epikutano testiranje kot alergen, in najdenega ni bilo nobenega poročila o primeru preobčutljivosti pri človeku.

(**) Podatki o MP niso na voljo.

⁽¹⁾ Kemikalije je treba pripravljati dnevno, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

⁽²⁾ Zaradi morebitnega vpliva različnih nosilcev na učinkovitost LLNA je treba uporabljati priporočen nosilec za vsako referenčno kemikalijo (24) (32).

⁽³⁾ Povprečna vrednost v primerih, ko je bila na voljo več kot ena vrednost EC3. Pri negativnih snoveh (tj. s stimulacijskim indeksom < 3) je navedena najvišja preskušena koncentracija.

⁽⁴⁾ Število študij LLNA, s katerimi so bili pridobljeni podatki.

⁽⁵⁾ Na tržišču na voljo pod imenom Kathon CG (št. CAS 55965-84-9), ki je zmes CMI in MI v razmerju 3:1. Relativne koncentracije vsake sestavine so od 1,1 % do 1,25 % (CMI) in od 0,3 % do 0,45 % (MI). Neaktivne sestavine so magnezijeve soli (21,5 % do 24 %) in bakrov nitrat (0,15 % do 0,17 %), s preostalo sestavo 74 % do 77 % vode. Kathon CG je dostopen preko podjetij Sigma-Aldrich in Rohm and Haas (zdaj Dow Chemical Corporation).

III. Opredeljeni standardi zanesljivosti in natančnosti

7. Natančnost podobne ali spremenjene metode LLNA mora pri ocenjevanju z uporabo 18 referenčnih kemikalij, ki jih je treba uporabiti, dosegati ali presežati natančnost standardov učinkovitosti za LLNA. Rezultat nove ali spremenjene metode mora biti pravilna razvrstitev na podlagi odločitve „da/ne“. Vendar pa nova ali spremenjena metoda morda ne bo pravilno razvrstila vseh 18 referenčnih kemikalij, ki jih je treba uporabiti. Če je, na primer, eden od šibkih povzročiteljev preobčutljivosti napačno razvrščen, se lahko za dokaz enake učinkovitosti upoštevajo utemeljitev za napačno razvrstitev in ustrezni podatki (npr. rezultati preskusa, ki zagotavljajo pravilno razvrstitev drugih snovi s fizikalnimi in kemijskimi lastnostmi ter lastnostmi, ki povzročajo preobčutljivost, podobnimi lastnostim napačno razvrščene referenčne kemikalije). V takih okoliščinah se status validacije novih in spremenjenih preskusnih metod za LLNA oceni za vsak primer posebej.

Ponovljivost v laboratoriju

8. Za ugotavljanje ponovljivosti v laboratoriju se nova ali prilagojena metoda LLNA oceni z uporabo snovi, ki povzroča preobčutljivost in je natančno opredeljena v LLNA. Zato standardi učinkovitosti za LLNA temeljijo na spremenljivosti rezultatov ponovljenih preskusov s heksil cimetovim aldehydom (HCA). Za oceno zanesljivosti v laboratoriju je treba vrednosti ocenjenega praga koncentracije (ECt) za HCA pridobiti ob štirih različnih priložnostih, med preskusi pa mora biti vsaj en teden razmaka. Sprejemljivo ponovljivost v laboratoriju kaže zmožnost laboratorija, da pri vsakem preskusu s HCA pridobi vrednosti ECt med 5 % in 20 %, kar predstavlja razpon od 0,5 do 2,0-krat povprečne ocenjene koncentracije, potrebne za stimulacijski indeks 3 (EC3), določene za HCA (10 %) pri LLNA (glej preglednico 1).

Ponovljivost v laboratorijih

9. Ponovljivost nove ali prilagojene metode LLNA v laboratorijih se oceni z uporabo dveh snovi, ki povzročata preobčutljivost in sta natančno opredeljeni v LLNA. Standardi učinkovitosti za LLNA temeljijo na spremenljivosti rezultatov preskusov s HCA in 2,4-dinitroklorobenzenom (DNCB) v različnih laboratorijih. Vrednosti ECt je treba pridobiti neodvisno in z eno samo študijo, izvedeno v vsaj treh ločenih laboratorijih. Za prikaz sprejemljive ponovljivosti v laboratorijih mora vsak laboratorij pridobiti vrednosti ECt od 5 % do 20 % za HCA in od 0,025 % do 0,1 % za DNCB, kar predstavlja razpon od 0,5 do 2,0-krat povprečne koncentracije EC3, določene za HCA (10 %) oziroma DNCB (0,05 %), pri LLNA (glej preglednico 1).

Dodatek 2

Opredelitve pojmov

Natančnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode z uveljavljenimi referenčnimi vrednostmi. To je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz „skladnost“ se pogosto izmenično uporabljata za pomen deleža ustreznih rezultatov preskusne metode (14).

Primerjalna snov: snov, ki povzroča preobčutljivost ali je ne povzroča in se uporablja kot standard za primerjavo s preskusno snovjo. Primerjalna snov mora imeti naslednje lastnosti: (i) trajen in zanesljiv vir; (ii) strukturno in funkcijsko podobnost z razredom preskušanih snovi; (iii) znane fizikalno-kemijske lastnosti; (iv) podporne podatke o znanih učinkih in (v) znano učinkovitost v razponu zelene reakcije.

Ocenjen prag koncentracije (ECt): ocenjena koncentracija preskusne snovi, potrebne za stimulacijski indeks, ki kaže na pozitiven rezultat.

Ocenjena koncentracija tri (EC3): ocenjena koncentracija preskusne snovi, potrebne za stimulacijski indeks tri.

Lažno negativna snov: preskusna snov, ki je s preskusno metodo nepravilno opredeljena kot negativna ali neaktivna, čeprav je dejansko pozitivna ali aktivna.

Lažno pozitivna snov: preskusna snov, ki je s preskusom nepravilno opredeljena kot pozitivna ali aktivna, čeprav je dejansko negativna ali neaktivna.

Nevarnost: možnost škodljivega učinka na zdravje ali okolje. Do škodljivega učinka pride, če je raven izpostavljenosti dovolj visoka.

Ponovljivost v laboratorijih: merjenje obsega, v katerem lahko različni kvalificirani laboratoriji, ki uporabljajo isti protokol in preskušajo iste preskusne snovi, pridejo do kvalitativno in kvantitativno podobnih rezultatov. Ponovljivost v laboratorijih se ugotovi med postopki pred validacijo in med validacijo ter kaže, v kakšnem obsegu se lahko preskus uspešno uporablja v več laboratorijih; imenuje se tudi ponovljivost v različnih laboratorijih (14).

Ponovljivost v laboratoriju: določitev, obsega, v katerem lahko kvalificirane osebe v istem laboratoriju uspešno ponovijo rezultate z uporabo določenega protokola v različnem času. Imenuje se tudi ponovljivost znotraj laboratorija (14).

Podobni preskus: pogovorni izraz za preskusno metodo, ki je strukturno in funkcijsko podobna potrjeni in uveljavljeni referenčni preskusni metodi. Takšna preskusna metoda je primerna za naknadno validacijo. Uporablja se izmenično s podobno preskusno metodo (14).

Izločitev: izločitev je ugotovitev, ki se izrazito razlikuje od drugih vrednosti v naključnem vzorcu populacije.

Standardi učinkovitosti: standardi, ki temeljijo na validirani preskusni metodi, na podlagi katere se lahko ocenjuje primerljivost predlagane preskusne metode, ki je v mehaničnem in funkcijskem smislu podobna. Obsegajo: i) nujne elemente preskusne metode, ii) najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij, izbranih iz skupine kemikalij, ki se uporabljajo za dokazovanje sprejemljive učinkovitosti validirane preskusne metode, in iii) podobne stopnje natančnosti in zanesljivosti, ki temeljijo na rezultatu uporabe validirane preskusne metode, kar mora pri ocenjevanju dokazati predlagana preskusna metoda ob uporabi najkrajšega možnega seznama referenčnih kemikalij (14).

Lastniška preskusna metoda: preskusna metoda, pri kateri sta proizvodnja in distribucija omejeni s patenti, avtorskimi pravicami, blagovnimi znamkami itd.

Zagotavljanje kakovosti: postopek upravljanja, pri katerem posamezniki, neodvisni od oseb, ki so izvajale preskuse, ocenijo izpolnjevanje laboratorijskih standardov za preskušanje, zahtev in postopkov vodenja evidenc ter natančnosti prenosa podatkov.

Referenčne kemikalije: kemikalije, izbrane za uporabo v postopku validacije, za katere so odzivi referenčnega preskusnega sistema ali želenih vrst *in vitro* ali *in vivo* že znani. Te kemikalije morajo biti reprezentativne za razrede kemikalij, za katere naj bi se uporabila preskusna metoda, predstavljati pa morajo celoten razpon odzivov, ki se jih lahko pričakuje od kemikalij, za katere bo morda uporabljena, od močnega, do šibkega, do negativnega. Za različne faze validacije in različne preskusne metode ter preskusne uporabe so lahko potrebne različne skupine referenčnih kemikalij (14).

Ustreznost: opis odnosa med preskusom in želenim učinkom ter njegovim pomenom in uporabnostjo za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskus pravilno izmeri ali napove želeni biološki učinek. Ustreznost vključuje upoštevanje natančnosti (skladnosti) preskusne metode (14).

Zanesljivost: stopnja ponovljivosti preskusne metode v laboratorijih in med njimi v določenem časovnem obdobju pri uporabi istega protokola. Ocení se z izračunom ponovljivosti v enem ali več laboratorijih (14).

Preobčutljivost kože: imunološki proces, ki se pojavi, ko je občutljiv posameznik lokalno izpostavljen kemičnemu alergen, ki na koži sproži imunski odziv in lahko povzroči razvoj preobčutljivosti ob stiku.

Stimulacijski indeks (SI): vrednost, izračunana za oceno morebitne preobčutljivosti kože, ki jo lahko povzroči preskusna snov; je razmerje med množenjem v tretiranih skupinah in množenjem v primerjalni kontrolni skupini z nosilcem.

Preskusna snov (imenovana tudi preskusna kemikalija): katera koli snov ali zmes, preskušana z uporabo te preskusne metode.

Validirana preskusna metoda: preskusna metoda, za katero sta bili na podlagi validacijskih študij določeni ustreznost (vključno z natančnostjo) in zanesljivost za določen namen. Treba je opozoriti, da natančnost in zanesljivost validirane preskusne metode nista nujno zadostni, da bi bili sprejemljivi za predlagani namen (14).“

2. Poglavje B.46 se nadomesti z naslednjim:

„B.46. PRESKUS DRAŽENJA KOŽE IN VITRO: PRESKUSNA METODA REKONSTRUIRANE ČLOVEŠKE POKOŽNICE

UVOD

1. Draženje kože pomeni nastanek popravljive poškodbe kože po nanosu preskusne snovi za največ 4 ure [kot je določeno v Globalnem usklajenem sistemu za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS) Združenih narodov (ZN) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi in zmesi (1) (3)]. Ta preskusna metoda zajema postopek *in vitro*, ki se lahko uporablja za ugotavljanje nevarnosti dražilnih kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s kategorijo 2 standardov po GHS ZN in uredbo CLP EU (1) (2) (3). V EU in drugih regijah, ki niso sprejele neobvezne kategorije 3 po GHS ZN (blage dražilne snovi), se lahko ta preskusna metoda uporabi tudi za opredelitev nerazvrščenih kemikalij, tj. „Brez kategorije“ po GHS ZN in CLP EU (1) (3). Ta preskusna metoda se lahko uporabi za določitev razdraženosti kože zaradi kemikalije kot samostojni nadomestni preskus za preskušanje draženja kože *in vivo* v okviru strategije stopenjskega preskušanja (4 in poglavje B.4 te priloge).

2. Ocenjevanje razdraženosti kože se običajno izvaja na laboratorijskih živalih [Smernica za preskušanje OECD 404; poglavje B.4 v tej prilogi] (4). V skladu s prizadevanji za dobro počutje živali je bila metoda B.4 leta 2004 pregledana in omogoča določitev jedkosti za kožo/draženja kože z uporabo strategije stopenjskega preskušanja, pri čemer se uporabljata validirani metodi *in vitro* ali *ex vivo*, da se tako preprečijo bolečine in trpljenje živali. Tri validirane preskusne metode *in vitro* so bile sprejete kot smernice za preskušanje OECD 430, 431 in 435 (5) (6) (7) in dve od njih kot poglavji B.40 in B.40a te priloge, ki se uporabljajo za del strategije stopenjskega preskušanja B.4 ali Smernice za preskušanje OECD 404 (4), ki se nanaša na jedkost.
3. Ta preskusna metoda obravnava končni učinek draženja kože na zdrave ljudi. Temelji na rekonstruirani človeški pokožnici, ki je v svoji zasnovi (uporaba netransformiranih človeških keratinocitov pokožnice kot vira celic, vzorčnega tkiva in citoarhitekture) zelo podobna biološkim in fiziološkim značilnostim zgornjih delov človeške kože, tj. pokožnice. Ta preskusna metoda vključuje tudi skupino standardov učinkovitosti (Dodatek 2) za ocenjevanje podobnih in spremenjenih preskusnih metod za rekonstruirano človeško pokožnico, ki jih je razvil evropski ECVAM (8), v skladu z načeli smernice OECD št. 34 (9).
4. Ta preskusna metoda se upošteva pri treh validiranih metodah. Predvalidacijske, optimizacijske in validacijske študije so dopolnjene s preskusno metodo *in vitro* (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), pri kateri se uporabljajo modeli rekonstruirane človeške pokožnice, na tržišču pa je na voljo pod imenom EpiSkinTM (validirana referenčna metoda – VRM). Dve drugi metodi *in vitro* za preskušanje draženja kože na rekonstruirani človeški pokožnici, ki sta na voljo na tržišču, sta v skladu z validacijo na podlagi standardov učinkovitosti pokazali podobne rezultate kot validirana referenčna metoda (21). To sta metodi EpiDermTM SIT (EPI-200) in SkinEthicTM RHE (22).
5. Preden se lahko predlagana podobna ali spremenjena *in vitro* metoda rekonstruirane človeške pokožnice, razen validirane referenčne metode, metode EpiDermTM SIT (EPI-200) ali metode SkinEthicTM RHE, uporabi v zakonodajne namene, je treba ugotoviti njeno zanesljivost, ustreznost (natančnost) in omejitve glede njene namenjene uporabe ter tako zagotoviti, da se jo lahko šteje za podobno validirani referenčni metodi v skladu s standardi učinkovitosti iz te preskusne metode (Dodatek 2). Poleg tega se priporoča, da se pred razvojem in validiranjem podobne ali spremenjene metode rekonstruirane človeške pokožnice *in vitro* ter njeno predložitvijo za sprejetje v zakonodajo preuči obrazložiten referenčni dokument OECD o preskušanju draženja kože *in vitro* (23).

OPREDELITVE POJMOV

6. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI POMISLEKI IN OMEJITVE

7. Omejitev preskusne metode, kot je pokazala validacijska študija (16), je, da ne omogoča uvrstitve kemikalij v neobvezno kategorijo 3 po GHS ZN (blage dražilne snovi) (1). Kadar se uporablja kot delni nadomestni preskus, se morda zahteva nadaljnje preskušanje *in vivo* za nadaljnjo karakterizacijo dražilnosti (4 in poglavje B.4 te priloge). Upošteva se, da se pri uporabi človeške kože upoštevajo nacionalna in mednarodna etična načela in okoliščine.
8. Ta preskusna metoda obravnava element draženja kože *in vitro* strategije stopenjskega preskušanja metode B.4 (Smernica za preskušanje OECD 404) o jedkosti/draženju za kožo (4). Ta preskusna metoda sicer ne zagotavlja ustreznih informacij o jedkosti za kožo, vendar je treba spomniti, da metoda B.40a (Smernica za preskušanje OECD 431) o jedkosti za kožo temelji na istem sistemu rekonstruirane človeške pokožnice, uporablja pa drug protokol (poglavje B.40a). Ta metoda temelji na modelih rekonstruirane človeške pokožnice, ki uporabljajo človeške keratinocite in tako predstavljajo *in vitro* ciljni organ zelene vrste. Poleg tega neposredno vključuje prvo stopnjo kaskadne reakcije vnetja/mehanizma delovanja (poškodba celic in poškodba tkiva, posledica pa je lokalizirana poškodba), do katere pride med draženjem *in vivo*. V postopku validacije, na katerem temelji ta preskusna metoda, so bile preskušene številne kemikalije, empirična zbirka podatkov validacijske študije pa skupno obsega 58 kemikalij (16)(18)(23). To velja za trdne snovi, tekoče snovi, poltrdne snovi in voske. Tekoče snovi so lahko vodne raztopine ali ne, trdne snovi so lahko topne ali netopne v vodi. Če je mogoče, je treba trdne snovi pred uporabo zmleti v fin prah; druga predhodna obdelava vzorca ni potrebna. Plini in aerosoli še niso bili ocenjeni v validacijski študiji (24). Čeprav se lahko preskusijo z uporabo tehnologije rekonstruirane človeške pokožnice, veljavna preskusna metoda ne dovoljuje preskušanja plinov in aerosolov. Opozoriti je treba tudi, da lahko močno obarvane kemikalije vplivajo na merjenje sposobnosti preživetja celic, zato je treba za popravke uporabiti prilagojene kontrole (glej odstavke 24–26).
9. Kadar je razvrstitev nedvoumna, bi moralo za preskusno kemikalijo zadoščati eno samo preskušanje, sestavljeno iz treh dvojnikov tkiv. V primeru mejnih rezultatov, kot so neskladne ponovne meritve in/ali povprečni odstotek sposobnosti preživetja, enak $50 \pm 5 \%$, je treba preučiti možnost izvedbe drugega preskušanja in nato še tretjega, če so rezultati prvih dveh preskušanj neskladni.

NAČELO PRESKUSNE METODE

10. Preskusna kemikalija se površinsko nanese na tridimenzionalni model rekonstruirane človeške pokožnice, ki vključuje netransformirane keratinocite človeške pokožnice, gojene za večplastni, zelo raznolik model človeške pokožnice. Sestavljajo ga organizirane bazalne, spinalne in zrnate plasti ter večplastna rožena plast, ki vključuje medcelične lamelarne maščobne plasti, ki predstavljajo glavne razrede maščob in so podobni strukturi *in vivo*.

11. S kemikalijami izzvano draženje kože, ki se pokaže v obliki rdečine in otekline, je rezultat kaskadnih reakcij, ki se začnejo s prodiranjem v roženo plast in poškodbo spodaj ležečih plasti keratinocitov. Odmirajoči keratinociti sprostijo posrednike, ti pa sprožijo kaskadne reakcije vnetja, ki deluje na celice v usnjici, zlasti na celice strome in endotelne celice. Zaradi razširitve in povečane prepustnosti endotelnih celic nastane opazna rdečina in otekline (24). Metode na podlagi rekonstruirane človeške pokožnice merijo začetne dogodke v kaskadni reakciji.
12. Sposobnost preživetja celic v modelih rekonstruirane človeške pokožnice se meri z encimsko pretvorbo vitalnega barvila MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, Thiazolyl blue; številka CAS 298-93-1] v soli modrega formazana, katere količina se izmeri po ekstrakciji iz tkiv (25). Dražilne kemikalije se prepozna zaradi zmožnosti zmanjšanja sposobnosti preživetja celic pod opredeljene vrednosti praga (tj. $\leq 50\%$, za kategorijo 2 po GHS ZN/CLP EU). Odvisno od zakonodajnega okvira, v katerem se uporabljajo rezultati te preskusne metode, se lahko kemikalije, ki vplivajo na sposobnost preživetja celic nad opredeljeno vrednostjo praga, štejejo za nedražilne snovi (tj. $> 50\%$, brez kategorije).

DOKAZOVANJE STROKOVNOSTI

13. Pred redno uporabo katere koli od treh validiranih metod, pri kateri se upošteva ta preskusna metoda, morajo laboratoriji dokazati tehnično strokovnost z uporabo desetih referenčnih kemikalij, navedenih v preglednici 1. Za podobne metode, ki so razvite v okviru te preskusne metode, ali za spremembe katere od treh validiranih metod morajo biti pred začetkom uporabe metode kot predpisanega preskušanja izpolnjene zahteve glede standardov učinkovitosti, opisanih v Dodatku 2 te preskusne metode.
14. V okviru dokazovanja strokovnosti se priporoča, da uporabnik po prejetju preveri pregrado tkiv, kakor to določa proizvajalec modela rekonstruirane človeške pokožnice. To je zlasti pomembno, če tkiva potujejo na dolge razdalje/dalj časa. Potem ko je metoda uspešno vzpostavljena in je dokazana strokovnost glede njene uporabe, redno preverjanje tkiv ni več potrebno. Vendar se priporoča, da se ob redni uporabi metode še naprej ocenjujejo značilnosti pregrade tkiv v rednih časovnih razmikih.

Preglednica 1

Referenčne kemikalije ⁽¹⁾

Kemikalija	Št. CAS	Rezultat preskusa in vivo ⁽²⁾	Agregatno stanje	Kategorija po GHS ZN/CLP EU
Naftalen ocetna kislina	86-87-3	0	trdno	brez kategorije
Izopropanol	67-63-0	0,3	tekoče	brez kategorije
Metil stearat	112-61-8	1	trdno	brez kategorije
Heptil butirat	5870-93-9	1,7	tekoče	brez kategorije (neobvezna kat. 3) ⁽³⁾ , ⁽⁴⁾
Heksil salicilat	6259-76-3	2	tekoče	brez kategorije (neobvezna kat. 3) ⁽³⁾ , ⁽⁴⁾
Ciklamen aldehid	103-95-7	2,3	tekoče	kat. 2
1-bromoheksan	111-25-1	2,7	tekoče	kat. 2
Kalijev hidroksid (5-odstotni vodni)	1310-58-3	3	tekoče	kat. 2
1-metil-3-fenil-1-piperazin	5271-27-2	3,3	trdno	kat. 2
Heptanal	111-71-7	3,4	tekoče	kat. 2

⁽¹⁾ Te referenčne kemikalije so podmnožica referenčnih kemikalij, uporabljenih v validacijski študiji.

⁽²⁾ Rezultat in vivo v skladu z metodo B.4 in Smernico za preskušanje OECD 404 ⁽⁴⁾.

⁽³⁾ V okviru te preskusne metode se neobvezna kategorija 3 po GHS ZN (blage dražilne snovi) (1) šteje kot „Brez kategorije“.

⁽⁴⁾ Neobvezna kategorija 3 po UN GHS se v okviru CLP EU ne uporablja.

POSTOPEK

15. V nadaljevanju so opisani elementi in postopki za ocenjevanje razdraženosti kože z metodo rekonstruirane človeške pokožnice. Model rekonstruirane človeške pokožnice mora biti rekonstruiran in je lahko pripravljen v podjetju ali kupljen na tržišču. Za EpiSkinTM, EpiDermTM SIT (EPI-200) in SkinEthicTM RHE so na voljo standardni operativni postopki (SOP) (26)(27)(28). Preskušanje se mora izvajati v skladu z naslednjimi zahtevami:

Elementi preskusne metode rekonstruirane človeške pokožnice

Splošni pogoji

16. Za rekonstrukcijo epitelija se uporabijo netransformirani človeški keratinociti. Pod funkcionalno roženo plastjo je več slojev živih epiteljskih celic (bazalna plast, trnasta plast, zrnata plast). Rožena plast mora biti razdeljena na več plasti in vsebovati lipidni profil za močno funkcionalno pregrado za zaustavitev hitre penetracije označevalcev citotoksičnosti, npr. natrijevega dodecil sulfata (SDS) ali Tritona X-100. Funkcija pregrade mora biti dokazana in se lahko oceni z določitvijo koncentracije, pri kateri označevalec po določenem času izpostavljenosti zmanjša sposobnost preživetja tkiv za 50 % (IC₅₀), ali z določitvijo časa izpostavljenosti, ki je potreben za zmanjšanje sposobnosti preživetja celic za 50 % (ET₅₀) po nanosu določene stalne koncentracije označevalca. Zadrževalne značilnosti modela rekonstruirane človeške pokožnice morajo preprečiti prehod materiala okoli rožene plasti v živo tkivo, kar bi preprečilo učinkovitost modelov za raziskovanje v zvezi z izpostavljenostjo kože. V modelu rekonstruirane človeške pokožnice ne sme biti bakterij, virusov, mikoplazme ali plesni.

Pogoji za funkcionalnost

Sposobnost preživetja

17. Analiza, uporabljena za določanje stopnje sposobnosti preživetja celic je analiza z MTT (25). Uporabniki modela rekonstruirane človeške pokožnice morajo zagotoviti, da vsaka serija modela rekonstruirane človeške pokožnice izpolnjuje merila, določena za negativno kontrolo. Optična gostota (OD) izvlečka ekstrakcijskega topila mora biti dovolj majhna, tj. OD < 0,1. Razpon sprejemljivosti (zgornjo in spodnjo mejo) za negativne kontrolne vrednosti optične gostote (v pogojih za preskusno metodo draženja kože) določi razvijalec/dobavitelj modela rekonstruirane človeške pokožnice, razponi sprejemljivosti za tri validirane metode pa so podani v preglednici 2. Zabeležiti je treba, da je negativno kontrolno tkivo, kar zadeva celične kulture, med preskušanjem stabilno (meritve sposobnosti preživetja celic so podobne).

Preglednica 2

Razpon sprejemljivosti za negativne kontrolne vrednosti optične gostote

	Spodnja meja sprejemljivosti	Zgornja meja sprejemljivosti
EpiSkin TM (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm TM SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic TM RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Pregradna funkcija

18. Rožena plast in njena maščobna sestava morata zadostovati za zaustavitev hitre penetracije citotoksičnih označevalcev, npr. SDS ali Triton X-100, kot se ocenjuje z IC₅₀ ali ET₅₀ (preglednica 3).

Morfologija

19. Opravljen mora biti histološki pregled modela rekonstruirane človeške pokožnice za prikaz strukture, podobne človeški pokožnici (vključno z večplastno roženo plastjo).

Ponovljivost

20. Rezultati kemikalije pozitivne kontrole in negativnih kontrol preskusne metode morajo dokazati ponovljivost.

Nadzor kakovosti

21. Razvijalec/dobavitelj modela rekonstruirane človeške pokožnice mora zagotoviti in dokazati, da vsaka serija modela rekonstruirane človeške pokožnice izpolnjuje opredeljena merila za sprostitev proizvodnje, med katerimi so najpomembnejša merila za *spodobnost preživetja* (odstavek 17), *pregradno funkcijo* (odstavek 18) in *morfologijo* (odstavek 19). Te podatke je treba zagotoviti uporabnikom metode, da lahko te informacije vključijo v poročilo. Razpon sprejemljivosti (zgornja in spodnja meja) za IC_{50} ali ET_{50} mora določiti dobavitelj modela rekonstruirane človeške pokožnice (ali raziskovalec ob uporabi lastnega modela). Le rezultati, doseženi z ustreznimi tkivi, se štejejo kot zanesljivi za napovedi v zvezi z razvrstitvijo draženja kože. Kot primer so v preglednici 3 navedeni razponi sprejemljivosti za tri validirane metode.

Preglednica 3

Primeri meril za nadzor kakovosti serije

	Spodnja meja sprejemljivosti	Zgornja meja sprejemljivosti
EpiSkin™ (SM) (18-urno preskušanje s SDS) (26)	$IC_{50} = 1,0 \text{ mg/ml}$	$IC_{50} = 3,0 \text{ mg/ml}$
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1-odstotni Triton X-100) (27)	$ET_{50} = 4,8 \text{ h}$	$ET_{50} = 8,7 \text{ h}$
SkinEthic™ RHE (1-odstotni Triton X-100) (28)	$ET_{50} = 4,0 \text{ h}$	$ET_{50} = 9,0 \text{ h}$

Nanos preskusnih in kontrolnih kemikalij

22. Za vsako preskusno kemikalijo in kontrole v vsaki ponovitvi je treba uporabiti vsaj tri dvojnike. Za tekoče in trdne snovi je treba uporabiti zadostno količino preskusne kemikalije, da se enakomerno prekrije površina pokožnice, pri čemer mora biti odmerek natančno določen, tj. najmanj $25 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ ali $25 \text{ mg}/\text{cm}^2$. Za boljši stik med preskusno kemikalijo in površino pokožnice je treba v primeru trdnih snovi površino pokožnice pred nanosom navlažiti z deionizirano ali destilirano vodo. Če je mogoče, je treba trdne snovi preskušati v obliki finega prahu. Ob koncu časa izpostavljenosti je treba preskusno kemikalijo skrbno sprati s površine pokožnice z vodnim pufrom ali 0,9-odstotnim NaCl. Glede na uporabljeni model rekonstruirane človeške pokožnice lahko čas izpostavljenosti traja od 15 do 60 minut, inkubacijska temperatura pa je od 20 do 37 °C. Ta obdobja izpostavljenosti in temperature se optimizirajo za vsako metodo rekonstruirane človeške pokožnice in predstavljajo različne vsebovane lastnosti metod; za podrobnosti glej Standardne operativne postopke za te metode (26) (27) (28).
23. Negativno kontrolo (NC) in pozitivno kontrolo (PC) je treba uporabiti istočasno za vsako ponovitev, da se dokaže, da so sposobnost preživetja celic (z negativno kontrolo), pregradna funkcija in posledična občutljivost tkiva (s pozitivno kontrolo) v okviru v preteklosti opredeljenega razpona sprejemljivosti. Predlagana snov za pozitivno kontrolo je 5-odstotni vodni SDS. Predlagani kemikaliji za negativno kontrolo sta voda ali fosfatni puffer s soljo (PBS).

Meritve sposobnosti preživetja celic

24. Pri postopku preskušanja je zelo pomembno, da se meritve sposobnosti preživetja celic ne opravljajo takoj po izpostavljenosti preskusnim kemikalijam, ampak v svežih gojiščih po dovolj dolgi inkubacijski dobi po preskušanju izpranih tkiv. Ta čas omogoča izboljšanje stanja, kar zadeva šibke citotoksične vplive, in pojav jasnih citotoksičnih vplivov. V fazi optimizacije preskusa (11) (12) (13) (14) (15) se je za optimalno izkazala 42-urna inkubacijska doba po preskušanju.
25. Analiza MTT je validirana kvantitativna metoda, ki jo je treba v okviru te preskusne metode uporabljati za merjenje sposobnosti preživetja celic. Ustrezna uporabi tridimenzionalne konstrukcije tkiva. Vzorec tkiva se za 3 ure potopi v ustrezno koncentracijo raztopine MTT (npr. 0,3 -1 mg/ml). S topilom (npr. izopropanolom, kislim izopropanolom) se izvleče oborina modrega formazana, potem pa se koncentracija formazana izmeri tako, da se določi OD pri valovni dolžini $570 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$.
26. Optične značilnosti preskusne kemikalije ali njenega kemijskega delovanja na MTT lahko zato ovirajo analizo, zaradi česar je lahko ocena sposobnosti preživetja celic lažna (ker lahko preskusna kemikalija prepreči obarvanje ali povzroči, da se razlikuje od običajnega). To se lahko zgodi, če se določena preskusna kemikalija s splakovanjem ne odstrani s kože v celoti ali če prodre v pokožnico. Če preskusna kemikalija deluje neposredno na MTT (snov, ki neposredno zmanjša MTT), je običajne barve ali se obarva med testiranjem tkiva, je treba izvesti dodatne kontrole, da se ugotovi in odpravi interference preskusne kemikalije s tehniko za merjenje sposobnosti preživetja. Za podrobnejši opis načina glede popravka neposrednega zmanjšanja MTT in vpliva obarvanih snovi glej Standardne operativne postopke za te tri validirane referenčne metode (26) (27) (28).

Merila za sprejemljivost

27. Za vsako metodo, pri kateri se uporabljajo veljavne serije rekonstruirane človeške pokožnice (glej odstavek 21), morajo negativna kontrolna tkiva izražati optično gostoto, iz katere je razvidna kakovost tkiv, pri katerih so se upoštevale zahtevane stopnje in vsi postopki protokola. Vrednosti kontrol optične gostote ne smejo biti nižje od v preteklosti postavljenih mej. Podobno morajo tkiva s pozitivno kontrolo, tj. 5-odstotnim vodnim SDS, kazati sposobnost tkiv, da se odzovejo na dražilne snovi v pogojih preskusne metode (26) (27) (28). S tem povezane in ustrezne meritve spremenljivosti med dvojniki tkiv je treba opredeliti (npr. v primeru uporabe standardnih odmikov mora biti njihova vrednost v okviru enostranskega 95-odstotnega intervala tolerance, izračunanega na podlagi preteklih podatkov; pri validirani referenčni metodi je standardni odmik $< 18 \%$).

Razlaga rezultatov in napovedni model

28. Vrednosti optične gostote, pridobljene z vsako preskusno kemikalijo, se lahko uporabijo za izračun deleža za preživetje sposobnih celic negativne kontrole, ki mora biti 100 %. Mejna vrednost deleža za preživetje sposobnih celic, ki dražilne preskusne kemikalije loči od nerazvrščenih, in statistični postopki, ki se uporabljajo za ocenjevanje rezultatov ter določanje dražilnih kemikalij, morajo biti natančno opredeljeni in zabeleženi ter dokazani kot ustrezni. Mejne vrednosti za napoved draženja so podane v nadaljevanju:

- Preskusna kemikalija se v skladu s kategorijo 2 po GHS ZN/CLP EU šteje kot dražilna za kožo, če je sposobnost preživetja tkiva po izpostavljenosti in inkubaciji po preskušanju manjša od ali enaka ($\leq$) 50 %.
- Odvisno od zakonodajnega okvira, v katerem se uporabljajo rezultati te preskusne metode, se preskusna kemikalija v skladu z oznako 'brez kategorije' po GHS ZN/CLP EU šteje kot snov, ki ne draži kože, če je sposobnost preživetja tkiva po izpostavljenosti in inkubaciji večja ($>$) od 50 %.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

29. Za vsako preskušanje je treba podatke o posameznih dvojnikih tkiv (npr. vrednosti optične gostote in podatke o izračunanem deležu za preživetje sposobnih celic za vsako preskusno kemikalijo, vključno z razvrščanjem) sporočiti v obliki preglednice, po potrebi vključno s podatki o ponovljenih preskusih. To pomeni, da je treba sporočiti standardni odmik $\pm$ za vsako preskušanje. Za vsako preskušano kemikalijo je treba sporočiti opaženo medsebojno vplivanje z reagentom MTT in obarvanimi preskusnimi kemikalijami.

Poročilo o preskusu

30. Poročilo o preskusu vsebuje naslednje informacije:

Preskušane in kontrolne kemikalije:

- kemijska imena, kot so ime in številka CAS, ime in številka EC, če je znana,
- čistost in sestava kemikalije (v odstotkih mase),
- fizikalno-kemijske značilnosti, ki so pomembne za izvedbo študije (npr. agregatno stanje, obstojnost, hlapnost, pH, topnost v vodi, če so znane),
- obdelava preskušanih/kontrolnih snovi pred preskušanjem, če je smiselno (npr. segrevanje, mletje),
- pogoji skladiščenja;

Utemeljitev uporabljenega modela rekonstruirane človeške pokožnice in protokola

Preskusni pogoji:

- uporabljeni sistem celic,
- popolne informacije za podporo specifičnemu uporabljenemu modelu rekonstruirane človeške pokožnice, vključno z njegovo učinkovitostjo. To lahko vključuje, vendar ni omejeno na:
 - (i) sposobnost preživetja;
 - (ii) pregradno funkcijo;
 - (iii) morfologijo;
 - (iv) ponovljivost in napovedljivost;
 - (v) nadzor kakovosti modela,
- podrobni podatki o preskusnem postopku,
- uporabljeni preskusni odmerki, čas izpostavljenosti in inkubacijska doba po preskušanju,
- opis vseh sprememb postopka preskušanja,

- sklicevanje na podatke o modelu, pridobljene v preteklosti. To lahko vključuje, vendar ni omejeno na:
 - (i) sprejemljivost podatkov o nadzoru kakovosti s sklicevanjem na podatke o seriji, pridobljene v preteklosti;
 - (ii) sprejemljivost vrednosti pozitivne in negativne kontrole s sklicevanjem na sredstva in razpone pozitivne in negativne kontrole,
- opis uporabljenih meril za ocenjevanje, vključno z zagovorom izbire mejnih vrednosti za napovedni model,
- sklicevanje na podatke, pridobljene v preteklosti;

Rezultati:

- evidentiranje podatkov posameznih preskusnih kemikalij za vsak preskus in vsako ponovljeno meritev,
- navedba kontrol, uporabljenih za snovi, ki neposredno zmanjšajo MTT, in/ali obarvane preskusne kemikalije,
- opis drugih opaženih učinkov;

Razprava o rezultatih

Sklep

VIRI

1. UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, UN New York and Geneva. Na voljo na spletni strani: 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. Na voljo na spletni strani: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
3. Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006. UL L 353, 31. 12. 2008, str. 1.
4. OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris. Na voljo na spletni strani: <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. Na voljo na spletni strani: <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. Na voljo na spletni strani: <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. Na voljo na spletni strani: <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)? Na voljo na spletni strani: <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. Na voljo na spletni strani: <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 . Na voljo na spletni strani: <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. Na voljo na spletni strani: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
21. EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Na voljo na spletni strani: <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. Na voljo na spletni strani: <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. Na voljo na spletni strani: 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. Na voljo na spletni strani: <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). Na voljo na spletni strani: <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. Na voljo na spletni strani: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
29. Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995), Irritant contact dermatitis, In: Practical Contact Dermatitis, str. 7–18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.
30. Direktiva Komisije 2001/59/ES z dne 6. avgusta 2001 o 28. prilagoditvi tehničnemu napredku Direktive Sveta 67/548/EGS o približevanju zakonov in drugih predpisov v zvezi z razvrščanjem, pakiranjem in označevanjem nevarnih snovi (UL L 225, 21.8.2001, str. 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.

Dodatek 1

Opredelitve pojmov

Natančnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode z uveljavljenimi referenčnimi vrednostmi. To je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz 'skladnost' se pogosto izmenično uporabljata za poimenovanje deleža ustreznih rezultatov preskusne metode (9).

Sposobnost preživetja celic: parameter za merjenje celotne dejavnosti celične populacije, npr. zmožnosti celičnih mitohondrijskih dehidrogenaz za redukcijo vitalnega barvila MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid], Thiazolyl blue), ki se glede na izmerjeni končni učinek in uporabljeni načrt preskusa ujema s skupnim številom in/ali sposobnostjo preživetja živih celic.

Skladnost: je merjenje učinkovitosti preskusne metode pri preskusnih metodah, s katerimi se dosežejo kategorični rezultati, in eden od vidikov ustreznosti. Izraz se izmenično uporablja z natančnostjo in je opredeljen kot delež vseh preskušanih kemikalij, ki so pravilno razvrščene kot pozitivne ali negativne. (9).

ET₅₀: lahko se oceni z določanjem časa izpostavljenosti, ki je potreben za zmanjšanje sposobnosti preživetja celic za 50 % po nanosu določene stalne koncentracije označevalca, glej tudi IC₅₀.

EU CLP (Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi): v Evropski uniji izvaja globalno usklajen sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (snovi in zmesi) Združenih narodov (3).

GHS (globalno usklajen sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij) Združenih narodov (ZN): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) s pomočjo standardiziranih vrst in stopenj fizikalnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za označevanje z npr. piktogrami, opozorilnimi besedami, izjavami o nevarnosti, varnostnimi izjavami in varnostnimi listi z namenom razširjanja informacij o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščite ljudi (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolja (1).

IC₅₀: lahko se oceni z določanjem koncentracije, pri kateri označevalec po določenem času izpostavljenosti zmanjša sposobnosti preživetja tkiva za 50 % (IC₅₀), glej tudi ET₅₀.

Prevelik odmerek: količina na pokožnico nanese preskusne kemikalije, ki je večja od količine, potrebne za celotno in enakomerno prekrivanje površine pokožnice.

Podobni preskus: pogovorni izraz za preskusno metodo, ki je strukturno in funkcijsko podobna potrjeni in uveljavljeni referenčni preskusni metodi. Takšna preskusna metoda je primerna za naknadno validacijo. Uporablja se izmenično s podobno preskusno metodo (9).

Standardi učinkovitosti: standardi, ki temeljijo na validirani referenčni metodi, na podlagi katere se lahko ocenjuje primerljivost predlagane preskusne metode, ki je v funkcijskem in mehaničnem smislu podobna referenčni. Obsegajo: i) nujne elemente preskusne metode, ii) najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij, izbranih iz skupine kemikalij, ki se uporabljajo za dokazovanje sprejemljive učinkovitosti validirane preskusne metode, ter iii) podobne stopnje natančnosti in zanesljivosti, ki temeljijo na rezultatih validirane preskusne metode, kar mora dokazati predlagana preskusna metoda pri ocenjevanju ob uporabi najkrajšega možnega seznama referenčnih kemikalij (9).

Referenčne kemikalije: kemikalije, izbrane za uporabo v postopku validacije, za katere so odzivi referenčnega preskusnega sistema ali želenih vrst *in vitro* ali *in vivo* že znani. Te kemikalije morajo biti reprezentativne za razrede kemikalij, za katere naj bi se uporabila preskusna metoda, predstavljati pa morajo celoten razpon odzivov, ki se jih lahko pričakuje od kemikalij, za katere bo morda uporabljena, od močnega, do šibkega, do negativnega. Za različne faze validacije in različne preskusne metode ter preskusne uporabe so lahko potrebne različne skupine referenčnih kemikalij (9).

Ustreznost: opis odnosa med preskusom in želenim učinkom ter njegovim pomenom in uporabnostjo za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskus pravilno izmeri ali napove želeni biološki učinek. Ustreznost vključuje upoštevanje natančnosti (skladnosti) preskusne metode (9).

Zanesljivost: stopnja reproduktivnosti preskusne metode v laboratorijih in med njimi v določenem časovnem obdobju pri uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom ponovljivosti v enem ali več laboratorijih (9).

Nadomestni preskus: preskus, ki bo nadomestil preskus v redni uporabi in ki je uveljavljen za ugotavljanje nevarnosti in/ali oceno tveganja ter za katerega je bilo ugotovljeno, da v primerjavi z uveljavljenim preskusom v vseh mogočih okoliščinah preskušanja in za vse mogoče preskusne kemikalije zagotavlja enakovredno ali izboljšano varstvo zdravja ljudi ali živali ali okolja, kot se uporablja (9).

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih preskusnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. To je merilo natančnosti za preskusno metodo, s katero se dosežejo kategorični rezultati, in je pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (9).

Draženje kože: draženje kože je nastanek popravljive poškodbe kože po nanosu preskusne snovi za največ 4 ure. Razdraženost kože je reakcija, ki je prisotna na posameznih mestih, ni imunogena in se pojavi kmalu po izpostavitvi kože draženju (29). Njena glavna lastnost je popravljiva narava, ki vključuje vnetne reakcije in večino značilnih kliničnih znakov razdraženosti (rdečino, oteklino, srbenje in bolečino), povezanih z vnetnim procesom.

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih preskusnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. To je merilo natančnosti za preskusno metodo, s katero se dosežejo kategorični rezultati, in je pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (9).

Strategija stopenjskega preskušanja: preskušanje, pri katerem se preskusne metode uporabljajo v zaporedju; o preskusnih metodah, izbranih v vsaki naslednji stopnji, se odloča na podlagi rezultatov na prejšnji stopnji preskušanja (9).

Preskusna kemikalija (imenovana tudi preskusna snov): katera koli snov ali zmes, preskušana z uporabo te preskusne metode.

Dodatek 2

Standardi učinkovitosti za oceno predlaganih podobnih ali spremenjenih metod rekonstruirane človeške pokožnice in vitro za draženje kože

UVOD

1. Namen standardov učinkovitosti je posredovati podlago, na kateri se lahko za nove metode, lastniške (tj. avtorske, zaščitene z blagovno znamko, registrirane) in nelastniške, ugotovi, da so ustrezno natančne in zanesljive za določene namene preskušanja. Ti standardi učinkovitosti, ki temeljijo na validiranih in uveljavljenih preskusnih metodah, se lahko uporabijo za oceno zanesljivosti in natančnosti drugih podobnih metod (ki se pogovorno imenujejo 'podobni' preskusi), ki temeljijo na podobnih znanstvenih načelih in merijo ali napovedujejo isti biološki ali toksični učinek (9).
2. Spremenjene metode (tj. predlagane morebitne izboljšave odobrene preskusne metode) je treba pred sprejetjem oceniti, da se ugotovi učinek predlaganih sprememb na učinkovitost preskusa in obseg, v katerem takšne spremembe vplivajo na informacije, ki so na voljo za druge elemente postopka validacije. Odvisno od števila in narave predlaganih sprememb, dobljenih podatkov in podporne dokumentacije za te spremembe se zanje izvede enak postopek validacije, kot je predpisan za nov preskus ali, po potrebi, omejena ocena zanesljivosti in ustreznosti z uveljavljenimi standardi učinkovitosti (9).
3. Podobne ali spremenjene metode katere koli od treh validiranih metod [EpiSkin™ (validirana referenčna metoda – VRM), EpiDerm™ SIT (EPI-200) in SkinEthic™ RHE], ki so predlagane za uporabo v okviru te preskusne metode, je treba oceniti ter določiti njihovo zanesljivost in natančnost z uporabo kemikalij, ki predstavljajo celoten razpon rezultatov preskusa Draize za draženje kože. Pri ocenjevanju z uporabo 20 priporočenih referenčnih kemikalij standardov učinkovitosti (preglednica 1) morajo biti predlagane podobne ali spremenjene metode tako zanesljive in natančne kot validirana referenčna metoda (preglednica 2) (2) (16). Vrednosti natančnosti in zanesljivosti, ki morajo biti dosežene, so navedene v odstavkih 8 do 12 tega dodatka. Vključene so nerazvrščene (brez kategorije po GHS ZN/CLP EU) in razvrščene (kategorija 2 po GHS ZN/CLP EU) (1) kemikalije, ki predstavljajo različne kemijske razrede, da se lahko zanesljivost in natančnost (občutljivost, specifičnost in splošna natančnost) predlagane metode primerjata z zanesljivostjo in natančnostjo validirane referenčne metode. Pred uporabo metode za preskušanje novih preskusnih kemikalij je treba določiti zanesljivost metode, njeno zmožnost, da pravilno opredeli dražilne kemikalije kategorije 2 po GHS ZN/CLP EU, in, odvisno od zakonodajnega okvira, za katerega se pridobivajo podatki, tudi njeno zmožnost, da pravilno opredeli kemikalije brez kategorije po GHS ZN/CLP EU.

4. Ti standardi učinkovitosti temeljijo na standardih učinkovitosti evropskega ECVAM (8) in so posodobljeni v skladu s sistemi po GHS ZN/CLP EU za razvrščanje in označevanje (1) (3). Prvotni standardi učinkovitosti so bili opredeljeni po končani validacijski študiji (21) in so temeljili na sistemu razvrščanja EU, kot ga določa Direktiva Komisije 2001/59/ES z dne 6. avgusta 2001 o 28. prilagoditvi tehničnemu napredku Direktive Sveta 67/548/EGS o približevanju zakonov in drugih predpisov v zvezi z razvrščanjem, pakiranjem in označevanjem nevarnih snovi⁽¹⁾. Zaradi sprejetja sistema po GHS ZN za razvrščanje in označevanje v EU (CLP EU) (3), do katerega je prišlo med zaključkom validacijske študije in dokončanjem te preskusne metode, so bili standardi učinkovitosti posodobljeni (8). Posodobitev se nanaša v glavnem na spremembe (i) sklopa referenčnih kemikalij standardov učinkovitosti ter (ii) opredeljenih vrednosti zanesljivosti in natančnosti (2) (23).

STANDARDI UČINKOVITOSTI ZA PRESKUSNE METODE REKONSTRUIRANE ČLOVEŠKE POKOŽNICE IN VITRO ZA DRAŽENJE KOŽE

5. Standardi učinkovitosti zajemajo naslednje tri elemente (9):

I. Nujne elemente preskusne metode

II. Najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij

III. Opredeljene vrednosti natančnosti in zanesljivosti

I. Nujni elementi preskusne metode

6. Vključujejo bistvene strukturne, funkcionalne in postopkovne elemente validirane metode, ki morajo biti vključeni v protokol predlagane, v funkcijskem in mehaničnem smislu podobne ali spremenjene metode. Ti elementi vključujejo edinstvene značilnosti metode, pomembne podrobnosti o postopku in ukrepe za nadzor kakovosti. Izpolnjevanje teh bistvenih elementov preskusne metode pomaga pri zagotavljanju, da podobna ali spremenjena metoda temelji na enakih konceptih kot ustrezna validirana referenčna metoda (9). Bistveni elementi preskusne metode so podrobneje opisani v odstavkih 16 do 21 preskusne metode, pri preskušanju pa je treba upoštevati naslednje:

- splošne pogoje (odstavek 16) in
- funkcionalne pogoje, ki obsegajo:
 - sposobnost preživetja (odstavek 17),
 - pregradno funkcijo (odstavek 18),
 - morfologijo (odstavek 19),
 - ponovljivost (odstavek 20), in
 - nadzor kakovosti (odstavek 21).

II. Najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij

7. Referenčne kemikalije se uporabljajo za ugotavljanje, ali sta zanesljivost in natančnost predlagane podobne ali spremenjene metode, ki se je izkazala za strukturno in funkcionalno dovolj podobno validirani referenčni metodi ali ki predstavlja manjšo spremembo ene od validiranih referenčnih metod, primerljivi z učinkovitostjo validirane referenčne metode 1 ali boljši kot VRM (2) (8) (16) (23). Med 20 priporočenimi referenčnimi kemikalijami, navedenimi v preglednici 1, so kemikalije, ki predstavljajo različne kemijske razrede (tj. kategorije kemikalij na podlagi funkcionalnih skupin) in so reprezentativne za celoten razpon rezultatov preskusa Draize za draženje kože (od nerazdražene do zelo razdražene kože). Kemikalije, vključene v seznam, obsegajo 10 kemikalij kategorije 2 po GHS ZN/CLP EU in 10 nerazvrščenih kemikalij, od katerih so 3 kemikalije iz neobvezne kategorije 3 po GHS ZN. V okviru te preskusne metode se neobvezna kategorija 3 šteje kot 'Brez kategorije'. Kemikalije iz preglednice 1 so glede na kemijsko delovanje in agregatno stanje izbrane iz kemikalij, uporabljenih v fazi optimizacije, ki je sledila predvalidaciji, in v validacijski študiji validirane referenčne metode (14) (18). Te referenčne kemikalije predstavljajo najmanjše možno število snovi, ki jih je treba uporabiti pri ocenjevanju natančnosti in zanesljivosti predlagane podobne ali spremenjene metode, vendar se ne smejo uporabljati za razvoj novih metod. Če navedena snov ni na voljo, se lahko uporabijo druge snovi, za katere so na voljo ustrezni referenčni podatki *in vivo*, zlasti iz kemikalij, uporabljenih v fazi optimizacije, ki je sledila predvalidaciji, in v validacijski študiji validirane referenčne metode. Po želji se lahko na najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij dodajo druge kemikalije, ki predstavljajo druge kemijske razrede in za katere so na voljo ustrezni referenčni podatki *in vivo*, da se dodatno oceni natančnost predlagane metode.

⁽¹⁾ UL L 225, 21.8.2001, str. 1.

Preglednica 1

Najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij za določitev vrednosti natančnosti in zanesljivosti za metode rekonstruirane človeške pokožnice za razdraženost kože ⁽¹⁾

Kemikalija	Številka CAS	Agregatno stanje	Rezultat preskusa in vivo	VRM in vitro kat.	GHS ZN/CLP EU in vivo kat.
1-bromo-4-kloropropan	6940-78-9	tekoče	0	kat. 2	brez kategorije
Dietil ftalat	84-66-2	tekoče	0	brez kategorije	brez kategorije
Naftalen očetna kislina	86-87-3	trdno	0	brez kategorije	brez kategorije
Alil fenoksiacetat	7493-74-5	tekoče	0,3	brez kategorije	brez kategorije
Izopropanol	67-63-0	tekoče	0,3	brez kategorije	brez kategorije
4-metiltio-benzaldehid	3446-89-7	tekoče	1	kat. 2	brez kategorije
Metil stearat	112-61-8	trdno	1	brez kategorije	brez kategorije
Heptil butirat	5870-93-9	tekoče	1,7	brez kategorije	brez kategorije
Heksil salicilat	6259-76-3	tekoče	2	brez kategorije	brez kategorije
Cinnamaldehyd	104-55-2	tekoče	2	kat. 2	brez kategorije (neobvezna kat.3) ⁽³⁾
1-dekanol ⁽²⁾	112-30-1	tekoče	2,3	kat. 2	kat. 2
Ciklamen aldehid	103-95-7	tekoče	2,3	kat. 2	kat. 2
1-bromoheksan	111-25-1	tekoče	2,7	kat. 2	kat. 2
2-klorometil-3,5-dimetil-4-metoksipiridinhidroklorid	86604-75-3	trdno	2,7	kat. 2	kat. 2
Di-n-propildisulfid ⁽²⁾	629-19-6	tekoče	3	brez kategorije	kat. 2
Kalijev hidroksid (5-odstotni vodni)	1310-58-3	tekoče	3	kat. 2	kat. 2
Benzenetiol, 5-(1,1-dimetilet)-2-metil	7340-90-1	tekoče	3,3	kat. 2	kat. 2
1-metil-3-fenil-1-piperazin	5271-27-2	trdno	3,3	kat. 2	kat. 2
Heptanal	111-71-7	tekoče	3,4	kat. 2	kat. 2
Tetrakloroetilen	127-18-4	tekoče	4	kat. 2	kat. 2

⁽¹⁾ Izbor kemikalij temelji na naslednjih merilih: (i) kemikalije so na voljo na tržišču, (ii), predstavljajo celoten niz rezultatov preskusa Draize za draženje kože (od nerazdražene do zelo razdražene kože), (iii) njihova kemična struktura je natančno opredeljena, (iv) predstavljajo kemijsko delovanje, ki je uporabljeno v validacijskem postopku, in (v), niso povezane z zelo strupenim profilom (npr. rakotvornim ali strupenim za reprodukcijski sistem) ali stroški zaradi prepovedane izpostavljenosti tem kemikalijam.

⁽²⁾ Kemikalije, ki so dražilne za kunce, vendar obstajajo zanesljivi dokazi, da niso dražilne za ljudi (31) (32) (33).

⁽³⁾ Po GHS ZN, ne po CLP EU.

III. Opredeljene vrednosti natančnosti in zanesljivosti

8. Za namene določanja zanesljivosti in ustreznosti predlaganih podobnih ali spremenjenih metod, ki se bodo uporabljale v več laboratorijih, je treba vseh 20 referenčnih kemikalij iz preglednice 1 preskusiti v vsaj treh laboratorijih. Če se bo predlagana metoda uporabljala v samo enem laboratoriju, preskušanje v več laboratorij za validacijo ne bo potrebno. Vendar pa je bistveno, da takšne validacijske študije v skladu z mednarodnimi smernicami neodvisno ocenijo mednarodno priznani organi za validacijo (9). V vsakem laboratoriju mora biti preskušanih vseh 20 kemikalij v treh neodvisnih ponovitvah, izvedenih z različnimi serijami tkiv in v intervalih, med katerimi je preteklo dovolj časa. Vsako ponovitev morajo sestavljati vsaj trije sočasno preskušani dvojniki tkiv za vsako vključeno preskusno kemikalijo, negativno kontrolo in pozitivno kontrolo.
9. Vrednosti zanesljivosti in natančnosti predlagane metode je treba izračunati ob upoštevanju vseh štirih meril, navedenih v nadaljevanju, s čimer se zagotovi, da so vrednosti zanesljivosti in ustreznosti izračunane na vnaprej določen in dosleden način:
 1. za izračun spremenljivosti in napovedljivosti (natanknosti) metode v laboratoriju in med laboratoriji se upoštevajo samo podatki ponovitev v celoti izvedenih zaporedij ponovitev;
 2. vsak sodelujoč laboratorij mora pri dokončnem razvrščanju vsake referenčne kemikalije upoštevati povprečno vrednost sposobnosti preživetja iz različnih izvedenih ponovitev preskusa v celoti izvedenega zaporedja ponovitev;
 3. pri izračunu spremenljivosti metode med laboratoriji se upoštevajo samo podatki, pridobljeni za kemikalije, za katere so bila zaporedja ponovitev v celoti izvedena v vseh sodelujočih laboratorijih;
 4. izračun vrednosti natančnosti se izvede na podlagi napovedi posameznega laboratorija, ki so jih različni sodelujoči laboratoriji pridobili za 20 referenčnih kemikalij.

V skladu s tem **zaporedje ponovitev** sestavljajo tri neodvisne ponovitve, ki jih izvede en laboratorij za eno preskusno kemikalijo. **V celoti izvedeno zaporedje ponovitev** je zaporedje ponovitev, ki jih izvede en laboratorij za eno preskusno kemikalijo, pri čemer so veljavne vse tri ponovitve. To pomeni, da ena sama neveljavna ponovitev razveljavi celotno zaporedje ponovitev, sestavljeno iz treh ponovitev.

Ponovljivost v laboratoriju

10. Ocena ponovljivosti v laboratoriju mora kazati skladnost razvrstitev (v kategorijo 2/brez kategorije po GHS ZN/CLP EU), ki se doseže z različnimi neodvisnimi ponovitvami preskusa z 20 referenčnimi kemikalijami v enem laboratoriju in je enaka ali večja ($\geq$) od 90 %.

Ponovljivost v različnih laboratorijih

11. Ocena ponovljivosti v različnih laboratorijih ni potrebna, če se bo predlagana preskusna metoda uporabljala le v enem laboratoriju. Za metode, ki se bodo uporabljale v več laboratorijih, mora biti skladnost razvrstitev (v kategorijo 2/brez kategorije po GHS ZN/CLP EU), ki se dosežejo z različnimi neodvisnimi ponovitvami preskusa z 20 referenčnimi kemikalijami, najboljše v najmanj treh laboratorijih, enaka ali večja ($\geq$) od 80 %.

Napovedljivost (natanknost)

12. Natančnost (občutljivost, specifičnost in splošna natančnost) predlagane podobne ali spremenjene metode mora biti primerljiva z natančnostjo validirane referenčne metode, ob upoštevanju dodatnih informacij, povezanih z ustreznostjo pri zelenih vrstah (preglednica 2). Občutljivost mora biti enaka ali večja ($\geq$) od 80 % (2) (8) (23). Nadaljnja posebna omejitev se nanaša na občutljivost predlagane metode *in vitro*, saj lahko samo dve kemikaliji kategorije 2 *in vivo*, 1-dekanol in di-n-propildisulfid, več kot en sodelujoči laboratorij napačno razvrsti kot brez kategorije. Specifičnost mora biti enaka ali večja ($\geq$) od 70 % (2) (8) (23). Glede specifičnosti predlaganih metod *in vitro* ni nobenih drugih omejitev, tj. kateri koli sodelujoči laboratorij lahko napačno razvrsti katero koli kemikalijo brez kategorije *in vivo*, če je končna specifičnost preskusne metode v sprejemljivem razponu. Splošna natančnost mora biti enaka ali večja ($\geq$) od 75 % (2) (8) (23). Čeprav je občutljivost validirane referenčne metode, izračunane za 20 referenčnih kemikalij iz preglednice 1, enaka 90 %, je opredeljena najnižja možna vrednost občutljivosti za katero koli podobno ali spremenjeno metodo, ki se šteje za veljavno, določena na 80 %, saj je za obe kemikaliji, 1-dekanol (mejna kemikalija) in di-n-propildisulfid (lažna negativna validirane referenčne metode), znano, da pri ljudeh ne povzročata draženja (31) (32) (33), čeprav sta bili pri preskusu s kunci opredeljeni kot dražilni snovi. Ker modeli rekonstruirane človeške pokožnice temeljijo na celicah človeškega izvora, lahko te kemikalije napovedo kot snovi, ki ne dražijo (brez kategorije po GHS ZN/CLP EU).

Preglednica 2

Zahtevane vrednosti napovedljivosti za občutljivost, specifičnost in splošno natančnost katere koli podobne ali spremenjene metode, ki se šteje za veljavno

Občutljivost	Specifičnost	Splošna natančnost
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Merila za sprejemljivost študije

13. Lahko se zgodi, da eden ali več preskusov v zvezi z eno preskusno kemikalijo ali več preskusnimi kemikalijami ne izpolnjuje meril za sprejemljivost preskusa za preskusne in kontrolne kemikalije ali pa ni sprejemljiv zaradi drugih razlogov. Za dopolnitev manjkajočih podatkov je za vsako preskusno kemikalijo dopustna izvedba največ dveh dodatnih preskusov (ponovno preskušanje). Natančneje, ker je treba v primeru ponovnega preskušanja primerjalno preskusiti tudi pozitivno in negativno kontrolo, sta lahko za vsako preskusno kemikalijo izvedeni največ dve dodatni ponovitvi.
14. Obstaja verjetnost, da vsak sodelujoči laboratorij za vsako referenčno kemikalijo tudi po ponovnem preskušanju ne bo dobil vsaj treh veljavnih ponovitev, zahtevanih za vsako preskušano kemikalijo, zaradi česar bo podatkovna matrika nepopolna. Da se zbirka podatkov štela za popolno, je treba v takih primerih izpolniti naslednja tri merila:
 1. pri vseh 20 referenčnih kemikalijah mora biti vsaj eno zaporedje ponovitev izvedeno v celoti;
 2. v vsakem od vsaj treh sodelujočih laboratorijev mora biti v celoti izvedenih vsaj 85 % zaporedij ponovitev (za 20 kemikalij; tj. v enem laboratoriju so dovoljena 3 neveljavna zaporedja ponovitev);
 3. v celoti izvedenih mora biti vsaj 90 % vseh zaporedij ponovitev iz vsaj treh laboratorijev (za 20 kemikalij, preskušanih v treh laboratorijih, tj. skupno je dovoljenih 6 neveljavnih zaporedij ponovitev).“
3. Dodajo se naslednja poglavja:

„B.49. PRESKUS MIKRONUKLEUSOV IN VITRO PRI CELICAH SESALCEV

UVOD

1. Analiza mikronukleusov *in vitro* je preskus genotoksičnosti za odkrivanje mikronukleusov v citoplazmi interfaznih celic. Mikronukleusi lahko izvirajo iz acentričnih kromosomskih delcev (tj. brez centromere) ali celih kromosomov, ki med anafazo celične delitve ne morejo potovati na pole. Analiza odkriva delovanje kemikalij, ki povzročajo strukturne in številčne poškodbe kromosomov (klastogene in aneogene snovi in zmesi) (1) (2) v celicah, pri katerih je med izpostavljenostjo preskusni snovi ali po njej prišlo do delitve celic. Ta preskusna metoda omogoča uporabo protokolov z inhibitorjem polimerizacije aktina citohalazina B (citoB). Dodatek citohalazina B pred načrtovano mitozo omogoča določitev in selektivno analizo frekvence mikronukleusov v celicah, v katerih se je zaključila ena mitoza, ker imajo takšne celice dve jedri (3) (4). Ta preskusna metoda omogoča uporabo protokolov brez citokinetskega bloka, če obstajajo dokazi, da je pri analizirani celični populaciji prišlo do mitoze.
2. Ob uporabi analize mikronukleusov *in vitro* za opredelitev kemikalij (snovi in zmesi), ki spodbujajo nastanek mikronukleusov, se lahko z uporabo citokinetskega bloka, imunokemijskega označevanja kinetohor ali hibridizacije s centromerno/telomerno sondo (fluorescenčna *in situ* hibridizacija (FISH)) prav tako pridobijo informacije o mehanizmihih poškodb kromosomov in nastanka mikronukleusov (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Postopek označevanja in hibridizacije se lahko uporabi v primeru povečanega nastajanja mikronukleusov, ko želi raziskovalec ugotoviti, ali je povečanje nastalo zaradi dogodkov, ki povzročajo strukturne in številčne poškodbe kromosomov (klastogenih in/ali aneogenih dogodkov).
3. Mikronukleusi predstavljajo poškodbo, ki je bila prenesena na hčerinske celice, pri čemer se kromosomske aberacije v metafaznih celicah ne morejo prenesti. Ker se lahko mikronukleusi v interfaznih celicah ocenijo razmeroma objektivno, mora laboratorijsko osebje ugotoviti samo, ali so se celice delile in koliko celic vsebuje mikronukleus. Zato se lahko priprave določi razmeroma hitro, analiza pa je lahko avtomatizirana. Zaradi tega se lahko pri vsakem tretiranju oceni na tisoče namesto na stotine celic, s čimer se poveča moč analize. Ker lahko mikronukleusi nastanejo zaradi zaostalih kromosomov, obstaja možnost odkritja snovi, ki povzročajo aneuploidijo in se pri klasičnih preskusih kromosomskih aberacij, glej npr. Smernico za preskušanje OECD 473 (poglavje B.10 te priloge), težko preučujejo (17). Vendar analiza mikronukleusov *in vitro* ne omogoča razlikovanja kemikalij, ki povzročajo poliploidijo, od tistih, ki povzročajo klastogenost, brez posebnih tehnik, kot je fluorescenčna *in situ* hibridizacija (FISH), opisana v odstavku 2.

4. Analiza mikronukleusov *in vitro* je metoda, pri kateri se običajno uporabljajo gojene človeške celice ali celice glodavcev. Zagotavlja celovito podlago za preiskovanje morebitnih poškodb kromosomov *in vitro*, saj lahko odkriva snovi, ki povzročajo strukturne in številčne poškodbe kromosomov (anevogene in klastogene).
5. Analiza mikronukleusov *in vitro* je zanesljiva in učinkovita pri različnih vrstah celic ter ob prisotnosti ali odsotnosti citohalazina B. Na voljo so obširni podatki, ki podpirajo veljavnost analize mikronukleusov *in vitro* pri različnih celičnih linijah glodavcev (CHO, V79, CHL/IU, in L5178Y) in človeških limfocitih (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Ti vključujejo zlasti mednarodne validacijske študije, ki jih usklajuje Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22), in poročila International Workshop on Genotoxicity Testing (4) (16). Razpoložljivi podatki so bili tudi ponovno ocenjeni v retrospektivni validacijski študiji glede zanesljivosti dokazov, ki jo je izvedel Evropski center za validacijo alternativnih metod (ECVAM) Evropske komisije, Znanstveni svetovni odbor ECVAM (ESAC) pa je preskusno metodo potrdil kot znanstveno veljavno (32) (33) (34). Opisana je bila uporaba celičnih linij človeških limfoblastov TK6 (35), celic HepG2 (36) (37) in primarnih embrionalnih celic sirijskega hrčka (38), čeprav v validacijskih študijah niso bile uporabljene.

OPREDELITVE POJMOV

6. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI

7. Pri preskusih, izvedenih *in vitro*, je treba običajno uporabiti zunanji vir aktivacije presnove, razen če so celice glede na snovi, ki se preskušajo, sposobne presnavljanja. Zunanji sistem aktivacije presnove ne posnema pogojev *in vivo* v celoti. Treba je tudi paziti, da se prepreči nastanek razmer, ki bi vodile do nepravilnih pozitivnih rezultatov, ki ne kažejo prave mutagenosti in so lahko posledica dejavnikov, kot je opazna sprememba pH ali osmolarnosti ali visoka raven citotoksičnosti (39) (40) (41). Če preskusna kemikalija v času dodajanja v medij vpliva na spremembo pH, je treba pH prilagoditi, po možnosti z dodajanjem pufru v založno raztopino, tako da vsi volumni pri vseh preskusnih koncentracijah in za vse kontrole ostanejo enaki.
8. Za analizo nastanka mikronukleusov je bistvenega pomena, da je do mitoze prišlo v tretiranih in netretiranih kulturah. Glede štetja mikronukleusov se največ podatkov pridobi s pomočjo celic, v katerih se je med tretiranjem s preskusno snovjo ali po njej zaključila ena mitoza.

NAČELO PRESKUSNE METODE

9. Človeške celične kulture ali celične kulture sesalcev so izpostavljene preskusni snovi z zunanjim virom aktivacije presnove ali brez nje, razen če so uporabljene celice z ustrezno sposobnostjo presnavljanja. V vsak preskus so vključene primerjalne (topilo/nosilec) kemikalije in kemikalije pozitivne kontrole.
10. Med izpostavljenostjo preskusni snovi ali po njej se celice gojijo tako dolgo, dokler zaradi poškodbe kromosoma ali vretena v interfaznih celicah ne pride do nastanka mikronukleusov. Za nastanek aneuploidije mora biti med mitozo navadno prisotna preskusna snov. Odvzete in obarvane interfazne celice se analizirajo glede prisotnosti mikronukleusov. Po možnosti se mikronukleuse šteje samo v tistih celicah, v katerih je med izpostavljenostjo preskusni snovi ali v obdobju po izpostavljenosti, če se uporabi, prišlo do mitoze. V kulturah, ki so bile tretirane s citokinetnim blokom, se to doseže s štetjem samo celic z dvema jedroma. Če citokinetni blok ni bil uporabljen, je treba dokazati, da bi pri analiziranih celicah verjetno prišlo do deljenja celic med izpostavljenostjo preskusni snovi ali po njej. Pri vseh protokolih je treba dokazati, da je do množenja celic prišlo v kontrolnih in tretiranih kulturah, v kulturah (ali vzporednih kulturah), pri katerih se štejejo mikronukleusi, pa je treba oceniti obseg citotoksičnosti ali citostaze, ki je nastala zaradi preskusne snovi.

OPIS ANALIZE

Pripravki

11. Lahko se uporabijo gojeni primarni človeški limfociti periferne krvi (5) (19) (42) (43) in številne celične linije glodavcev, kot so celice CHO, V79, CHL/IU, in L5178Y (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Uporabo drugih celičnih linij in vrst je treba utemeljiti na podlagi njihove dokazane učinkovitosti v analizi, kot je opisano v oddelku Merila za sprejemljivost. Ker pogostost mikronukleusov v ozadju vpliva na občutljivost analize, se priporoča uporaba celičnih vrst z nizko, stabilno pogostostjo nastajanja mikronukleusov v ozadju.

12. Človeški limfociti periferne krvi se pridobijo od mladih (starih približno 18–35 let), zdravih posameznikov, ki ne kadijo in ki v zadnjem času niso bili izpostavljeni genotoksičnim kemikalijam ali sevanju. Če so za uporabo zbrane celice od več kot enega donatorja, je treba določiti število donatorjev. Pogostost mikronukleusov se povečuje z leti, ta trend pa je bolj opazen pri ženskah kot pri moških (44), kar je treba pri upoštevanju pri izbiri donorskih celic.

Gojišča in pogoji gojenja

13. Pri vzdrževanju kultur se uporabijo ustrezna gojišča za kulture in pogoji inkubacije (posode za kulture, koncentracija CO₂, temperatura in vlažnost). Trajne celične linije in sevi se redno preverjajo, ali je v njih modalno kromosomsko število stabilno in ali niso okužene z mikoplazmo; okužene celične linije in sevi naj se ne uporabljajo. Poznati je treba običajni čas celičnega ciklusa za pogoje gojenja, ki se uporabljajo v preskuševalnem laboratoriju. Če se uporablja metoda citokineškega bloka, mora biti koncentracija citokineškega inhibitorja prilagojena določeni vrsti celic in dokazano mora biti, da zagotavlja dober izkoristek celic z dvema jedroma za štetje.

Priprava kultur

14. Trajne celične linije in sevi: celice se namnožijo iz založnih kultur, nasadijo v gojišče tako na gosto, da kultura ne bo dosegla konfluentne rasti v enojnih plasteh in kulture suspenzije ne bodo dosegle prevelike gostote preden se požanjejo, in se inkubirajo pri 37 °C.
15. Limfociti: celotna kri, tretirana z antikoagulantom (npr. heparinom), ali ločeni limfociti, so gojeni ob prisotnosti mitogena, npr. fitohemaglutinina (PHA) pred izpostavljenostjo preskusni snovi in citohalazinu B.

Aktivacija presnove

16. Pri uporabi celic z neustrezno notranjo sposobnostjo presnavljanja je treba uporabiti zunanje presnovne sisteme. Najpogosteje uporabljeni sistem je postmitohondrijska frakcija z dodanim kofaktorjem (S9), pripravljena iz jeter glodavcev, ki so bila tretirana s sredstvi za encimsko indukcijo, kot je Aroclor 1254 (45) (46), ali z zmesjo fenobarbitona in β-naftoflavona (46) (47) (48) (49). Slednja kombinacija ni v nasprotju s Stockholmsko konvencijo o obstojnih organskih onesnaževalih (50) in Uredbo (ES) št. 850/2004 o obstojnih organskih onesnaževalih (66), za nastanek oksidaz z mešano funkcijo pa se je v primerjavi s sredstvom Aroclor 1254 izkazala kot enako učinkovita (46) (47) (48) (49). Postmitohondrijska frakcija se običajno uporablja v koncentracijah 1–10 % (v/v) v končnem preskusnem gojišču. Pogoji sistema za aktivacijo presnove so lahko odvisni od skupine preskušane kemikalije in včasih je primerno uporabiti več kot eno koncentracijo S9.

17. Gensko spremenjene celične linije, v katerih se izražajo geni za točno določene aktivirajoče človeške encime ali encime glodavcev, lahko odpravijo potrebo po zunanjem sistemu aktivacije presnove in se lahko uporabijo kot preskusne celice. V takih primerih mora biti izbira uporabljenih celičnih linij znanstveno utemeljena, npr. s pomembnostjo oksidaze z mešano funkcijo za presnovo preskusne snovi (51) in njihovo odzivnostjo na znane snovi, ki povzročajo strukturne in številčne poškodbe kromosomov (anevogene in klastogene) (glej oddelek Merila za sprejemljivost). Priznati je treba, da izražene oksidaze z mešano funkcijo morda ne bodo presnavljale snovi, ki se preskuša; v takem primeru negativni rezultati ne bi pomenili, da preskusna snov ne more spodbuditi nastanka mikronukleusov.

Priprava preskusne snovi

18. Trdne kemikalije se pred obdelavo celic raztopijo v ustreznih topilih ali nosilcih, in po potrebi razredčijo. Tekoče kemikalije se lahko dodajo neposredno v preskusni sistem in/ali se pred obdelavo razredčijo. Plinaste ali hlapne kemikalije je treba preskušati z ustrezno spremenjenimi običajnimi protokoli, kot je obdelava v zatesnjenem nosilcu (52) (53). Uporabljajo se sveže pripravljene preskusne snovi, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

Preskusni pogoji

Topilo/nosilec

19. Topilo/nosilec ne sme reagirati v stiku s preskusno snovjo, prav tako pa mora biti pri uporabljeni koncentraciji združljivo s preživetjem celic ali ohranjanjem delovanja S9. Če se uporabijo manj znana topila/nosilci (npr. voda, gojišče celic, dimetil sulfoksid), morajo njihovo uporabo podpirati podatki, ki kažejo na njihovo združljivost s preskusno snovjo in njihovo pomanjkanje genotoksičnosti. Priporoča se, da je, kadar koli je to mogoče, prva izbira vodno topilo/nosilec.

Uporaba citohalazina B kot citokinetskega bloka

20. Eden od najpomembnejših dejavnikov pri učinkovitosti analize mikronukleusov *in vitro* je zagotavljanje, da je v celicah, ki se bodo štele, med izpostavljenostjo preskusni snovi ali v obdobju inkubacije po izpostavljenosti, če se uporabi, prišlo do mitoze. Citohalazin B je snov, ki se najbolj pogosto uporablja za blokado citokineze, ker povzroča sestavljanje aktina in tako preprečuje ločevanje hčerinskih celic po mitotizi, zaradi česar nastanejo celice z dvema jedroma (5) (54) (55). Štetje mikronukleusov je tako lahko omejeno na celice, pri katerih je med obdelavo ali po njej prišlo do mitoze. Učinek preskusne snovi na kinetiko množenja celic se lahko meri istočasno. Citohalazin B se kot citokinetski blok uporablja takrat, kadar se uporabljajo človeški limfociti, ker se trajanje celičnih ciklov razlikuje od kulture do kulture in od donatorja do donatorja, vsi limfociti pa se ne odzivajo na fitohemaglutinin (PHA). Pri preskušanju celičnih linij so bile uporabljene tudi druge metode za ugotavljanje, ali so se štete celice delile; te metode so obravnavane v nadaljevanju (glej odstavek 26).

21. Laboratorij za vsako vrsto celic določi ustrezno koncentracijo citohalazina B, da doseže optimalno pogostost celic z dvema jedroma v kontrolnih kulturah s topilom/nosilcem. Ustrezna koncentracija citohalazina B je običajno med 3 in 6 µg/ml.

Merjenje množenja celic in citotoksičnosti ter izbira koncentracij izpostavljenosti

22. Pri določanju najvišje koncentracije preskusne snovi, ki se bo preskušala, se je treba izogibati koncentracijam, pri katerih se lahko pojavijo nepravilni pozitivni odzivi, na primer koncentracijam, pri katerih se pojavijo čezmerna citotoksičnost, obarjanje v gojiščih in opazne spremembe pH ali osmolarnosti (39) (40) (41).
23. Izvedejo se meritve množenja celic, s čimer se zagotovi, da je v tretiranih celicah med analizo prišlo do mitoze in da je obdelava izvedena na ustreznih ravneh citotoksičnosti (glej odstavek 29). Citotoksičnost se določa z aktivacijo presnove in brez nje v celicah, pri katerih je aktivacija presnove potrebna, in sicer z uporabo relativnega povečanja števila celic (relative increase in cell counts, RICC) ali relativne podvojitve populacije (relative population doubling, RPD) (glej Dodatek 2 za formule), razen če se uporabi citohalazin B. Če se uporabi citohalazin B, se lahko citotoksičnost določi z indeksom pomnoževanja (RI) (glej Dodatek 2 za formulo).
24. Obdelava kultur s citohalazinom B in merjenje relativne pogostosti celic z enim, dvema ali več jedri v kulturi zagotavljata natančno metodo za količinsko opredelitev učinka na množenje celic in citotoksično ali citostatično delovanje obdelave (5) ter zagotavljata, da so preštete samo celice, pri katerih je prišlo do delitve med obdelavo ali po njej.
25. V študijah s citohalazinom B se lahko citostaza/citotoksičnost količinsko opredeli s pomočjo indeksa množenja citokinetskega bloka (cytokinesis-block proliferation index, CBPI) (5) (26) (56) ali določi s pomočjo indeksa pomnoževanja iz vsaj 500 celic na kulturo (glej Dodatek 2 za formule). Kadar se za oceno množenja celic uporablja citohalazin B, je treba CBPI ali RI določiti na podlagi vsaj 500 celic na kulturo. Te meritve se lahko poleg drugih uporabijo za oceno citotoksičnosti tako, da se primerjajo vrednosti v tretiranih in kontrolnih kulturah. Z oceno drugih označevalcev citotoksičnosti (npr. konfluentnost, število celic, apoptoza, nekroza, štetje v metafazi) se lahko pridobijo koristne informacije.
26. V študijah brez citohalazina B je treba dokazati, da so se celice, preštete v kulturi, delile med obdelavo s preskusno snovjo ali po njej; v nasprotnem primeru lahko pride do lažnih negativnih odzivov. Metode, ki so bile uporabljene za zagotavljanje, da so deljene celice štete, obsegajo vključitev in naknadno odkrivanje bromdeoksiuridina (BrdU) za določitev celic, ki so se podvojile (57), tvorbo klonov, kadar so celice iz stalnih celičnih linij tretirane in štetje *in situ* na stekelcu mikroskopa (indeks množenja (PI)) (25) (26) (27) (28), oziroma merjenje relativne podvojitve populacije (RPD) ali relativnega povečanja števila celic (RICC) ali druge preverjene metode (16) (56) (58) (59) (glej Dodatek 2 za formule). Z oceno drugih označevalcev citotoksičnosti ali citostaze (npr. konfluentnost, število celic, apoptoza, nekroza, štetje v metafazi) se lahko pridobijo koristne informacije.
27. Ocenijo se vsaj tri koncentracije, ki jih je mogoče analizirati. Da bi to dosegli, bo morda treba poskus izvesti z uporabo večjega števila koncentracij, ki so tesno skupaj, in analizirati tvorbo mikronukleusov v teh koncentracijah, ki zagotavljajo ustrezen razpon citotoksičnosti. Druga strategija je izvedba predhodnega preskusa citotoksičnosti, da se zoži razpon za končni preskus.
28. Najvišja koncentracija naj proizvede $55 \pm 5\%$ citotoksičnosti. Višje ravni lahko povzročijo poškodbo kromosomov kot drugotni učinek citotoksičnosti (60). Ko se citotoksičnost pojavi, naj izbrane preskusne koncentracije obsegajo razpon od tiste, ki povzroči $55 \pm 5\%$ citotoksičnosti, do tistih, ki povzročijo majhno citotoksičnost ali je sploh ne povzročijo.

29. Če toksičnost ali oborina nista opaženi, mora najvišja preskusna koncentracija ustrezati 0,01 M, 5 mg/ml ali 5 µl/ml, pri čemer se upošteva nižja od obeh vrednosti. Koncentracije, izbrane za analizo, se lahko na splošno razlikujejo za največ 10. Pri preskusnih snoveh, ki kažejo strmo krivuljo odziva na koncentracijo, je morda potrebna manjša razlika med koncentracijami, tako da se štejejo tudi kulture v zmernem in nizkem razponu toksičnosti.
30. Kadar je topnost omejitveni dejavnik, mora biti najvišja koncentracija, če ni omejena s citotoksičnostjo, najnižja koncentracija, pri kateri je v kulturah vidna najmanjša možna oborina, če pri štetju ni nobenih interferenc. Ocena oborine se izvede z metodami, kot je pregled s svetlobnim mikroskopom, s katerim se opazi oborino, ki ostaja ali se pojavi med gojenjem (do konca obdelave).

Kontrolni vzorci

31. V vsak poskus se vključijo primerjalni pozitivni kontrolni vzorci in kontrolni vzorci s topilom/nosilcem, ob aktivaciji presnove in brez nje.
32. Pozitivni kontrolni vzorci so potrebni za dokaz sposobnosti uporabljenih celic, protokol preskusa pa za opredelitev snovi, ki povzročajo strukturne in številčne poškodbe kromosomov (anevгене in klastogene) ter potrditev sposobnosti presnavljanja priprava S9. Pozitivni kontrolni vzorci morajo uporabiti znane povzročitelje tvorbe mikronukleusov pri koncentracijah, pri katerih se pričakuje majhno, vendar ponovljivo povečanje glede na ozadje, ki pokaže občutljivost preskusnega sistema. Koncentracije pozitivne kontrole naj se izberejo tako, da so učinki jasni, vendar ne razkrijejo takoj identitete kodiranih mikroskopskih preparatov.
33. Za prikaz sposobnosti presnavljanja in zmožnosti sistema, da odkriva klastogene, je treba uporabiti klastogen, pri katerem je potrebna aktivacija presnove (npr. ciklofosamid; benzo[a]piren). Uporabijo se lahko tudi druge ustrezne snovi pozitivne kontrole, če je to utemeljeno. Ker so lahko nekateri pozitivni kontrolni vzorci, ki potrebujejo aktivacijo presnove, v določenih pogojih obdelave ali določenih celičnih linijah aktivni brez zunanje aktivacije presnove, je treba potrebo po aktivaciji presnove in delovanje pripravka S9 preskusiti na izbrani celični liniji in z izbranimi koncentracijami.
34. Trenutno niso znani nobeni anevgeni, ki bi za svojo genotoksično delovanje potrebovali aktivacijo presnove (16). Trenutno uveljavljeni pozitivni kontroli za anevgeno delovanje sta, na primer, kolhicin in vinblastin. Druge kemikalije se lahko uporabijo, če vplivajo na nastanek mikronukleusov izključno ali v glavnem preko anevgenega delovanja. Da bi se izognili uporabi dveh pozitivnih kontrolnih vzorcev (za klastogenost in anevgenost) brez aktivacije presnove, je lahko kontrola anevgenosti pozitivna kontrola brez S9, kontrola klastogenosti pa se lahko uporablja za preskus ustreznosti uporabljenega sistema za aktivacijo presnove. Pozitivno kontrolo za klastogenost in anevgenost je treba uporabiti pri celicah, pri katerih uporaba S9 ni potrebna. Priporočeni pozitivni kontrolni vzorci so navedeni v Dodatku 3.
35. Če so na voljo ustrezne kemikalije, se lahko preuči možnost uporabe pozitivnih kontrol, ki sodijo v isto skupino kemikalij. Vsi uporabljeni pozitivni kontrolni vzorci morajo ustrezati vrsti celic in pogojem aktivacije.
36. Za vsak odvzem se pripravijo kontrolni vzorci, ki jih sestavlja le topilo ali nosilec. Uporabijo se tudi netretirani kontrolni vzorci, razen če objavljeni ali laboratorijski pretekli kontrolni podatki dokazujejo, da izbrano topilo pri uporabljenih koncentracijah ne povzroča genotoksičnih ali škodljivih učinkov.

PRESKUSNI POSTOPEK

Program tretiranja

37. Da bi bila verjetnost odkritja snovi, ki povzročajo številčne in strukturne poškodbe kromosomov (anevgene in klastogene snovi) ter delujejo v določeni fazi celičnega cikla, čim večja, mora biti s preskusno snovjo tretirano zadostno število celic v vseh fazah njihovih celičnih ciklov. Program tretiranja celičnih linij in primarnih celičnih kultur se lahko zato nekoliko razlikuje od tistega za limfocite, pri katerih je za začetek celičnega cikla potrebna stimulacija z mitogenom, kar je obravnavano v odstavkih 41–43 (16).
38. Teoretični premisleki skupaj z objavljenimi podatki (18) kažejo, da je večina snovi, ki povzročajo številčne in strukturne poškodbe kromosomov (anevgene in klastogene snovi) odkritih s kratkoročnim obdobjem tretiranja, ki traja 3 do 6 ur z dodanim pripravkom S9 ali brez, ki mu sledita odvzem preskusne snovi in obdobje rasti 1,5–2,0 celičnih ciklov (6). Celice se vzorčijo v času, ki je enak približno 1,5–2,0 dolžinama običajnega (tj. netretiranega) celičnega cikla po začetku ali ob koncu tretiranja (glej preglednico 1). Čas vzorčenja ali obnavljanja se lahko podaljša, če je znano ali se sumi, da preskusna snov vpliva na dolžino celičnega cikla (npr. pri preskušanju nukleozidnih analogov).

39. Zaradi morebitne citotoksičnosti pripravkov S9 za kultivirane celice sesalcev se podaljšana izpostavljenost v dolžini 1,5–2,0 običajnih celičnih ciklov uporablja samo, če S9 ni dodan. Pri podaljšanem tretiranju so na voljo možnosti, ki omogočajo tretiranje celic s preskusno kemikalijo z dodanim citohalazinom B ali brez njega. Te možnosti so namenjene primerom, kjer se lahko pojavi zaskrbljenost glede morebitnih interakcij med preskusno snovjo in citohalazinom B.
40. Priporočeni programi tretiranja celic so predstavljeni v preglednici 1. Ti splošni programi tretiranja se lahko prilagodijo glede na stabilnost ali reaktivnost preskusne snovi ali določenih značilnosti rasti uporabljenih celic. Vsa tretiranja se morajo začeti in končati med eksponentno rastjo celic. Ti programi so podrobneje predstavljeni v odstavkih 41–47, ki sledijo.

Preglednica 1

Obdobja tretiranja in odvzema celic za analizo mikronukleusov *in vitro*

Limfociti, primarne celice in celične linije, tretirane s citohalazinom B	+ S9	Obdelava traja 3–6 ur z dodanim S9; odstraniti se S9 in obdelovalno gojišče; dodata se sveže gojišče in citohalazin B; celice se odvzamejo po 1,5–2,0 običajnih celičnih ciklih.
	– S9 kratka izpostavljenost	Obdelava traja 3–6 ur; odstrani se obdelovalno gojišče; dodata se sveže gojišče in citohalazin B; celice se odvzamejo po 1,5–2,0 običajnih celičnih ciklih.
	– S9 daljša izpostavljenost	Možnost A: obdelava traja 1,5–2 dolžini običajnega celičnega cikla z dodanim citohalazinom B; celice se odvzamejo ob koncu obdobja izpostavljenosti. Možnost B: obdelava traja 1,5–2,0 običajna celična cikla; odstrani se preskusna snov; dodata se sveže gojišče in citohalazin B; celice se odvzamejo po 1,5–2,0 običajnih celičnih ciklih.

Celične linije, tretirane brez citohalazina B
(enako kot opisani programi tretiranja, vendar brez dodajanja citohalazina B)

Limfociti, primarne celice in celične linije, tretirane s citohalazinom B

41. Pri limfocitih je najučinkovitejši pristop z začetkom izpostavljenosti preskusni snovi 44–48 ur po stimulaciji fitohemaglutinina (PHA), ko ni več sinhronizacije ciklov (5). V prvotni analizi se celice obdelujejo 3 do 6 ur s preskusno snovjo z dodanim S9 ali brez njega. Obdelovalno gojišče se odstrani in nadomesti s svežim gojiščem, ki vsebuje citohalazin B, celice pa se odvzamejo čez 1,5–2,0 dolžini običajnega celičnega cikla.
42. Če sta oba prvotna preskusa pri kratki obdelavi (3–6 ur) negativna ali dvoumna, se izvede nadaljnja obdelava z daljšo izpostavljenostjo brez S9. Na voljo sta dve možnosti obdelave, ki sta enako sprejemljivi. Vendar je za stimuliranje limfocitov, pri katerih se lahko eksponentna rast po 96 urah po stimulaciji zmanjšuje, morda primernejša možnost A. Pri možnosti B celične kulture do končnega časa vzorčenja ne smejo postati strjene.
- Možnost A: celice se s preskusno snovjo obdelujejo 1,5–2,0 dolžini običajnih celičnih ciklov in odvzamejo ob koncu obdelave.
- Možnost B: celice se s preskusno snovjo obdelujejo 1,5–2,0 dolžini običajnega celičnega cikla. Obdelovalno gojišče se odstrani in nadomesti s svežim gojiščem, celice pa se odvzamejo po dodatnih 1,5–2,0 dolžinah običajnega celičnega cikla.
43. Primarne celice in celične linije se obdelajo na podoben način kot limfociti, vendar stimulacija s PHA 44–48 ur ni potrebna. Celice, ki niso limfociti, morajo biti izpostavljene tako, da so ob končani študiji še vedno v logaritemski fazi rasti.

Celične linije, tretirane brez citohalazina B

44. Celice se obdelujejo 3–6 ur z dodanim S9 in brez njega. Obdelovalno gojišče se odstrani in nadomesti s svežim gojiščem, celice pa se odvzamejo čez 1,5–2,0 dolžini običajnega celičnega cikla.
45. Če sta oba prvotna preskusa pri kratki obdelavi (3–6 ur) negativna ali dvoumna, se izvede nadaljnja obdelava z daljšo izpostavljenostjo (brez S9). Na voljo sta dve možnosti obdelave, ki sta enako sprejemljivi:
- Možnost A: celice se s preskusno snovjo obdelujejo 1,5–2,0 dolžini običajnega celičnega cikla in odvzamejo ob koncu obdelave.
 - Možnost B: celice se s preskusno snovjo obdelujejo 1,5–2,0 dolžini običajnega celičnega cikla. Obdelovalno gojišče se odstrani in nadomesti s svežim gojiščem, celice pa se odvzamejo po dodatnih 1,5–2,0 dolžinah običajnega celičnega cikla.
46. V enojnih plasteh so lahko po zaključku 3–6 ur trajajoče obdelave prisotne mitotične celice (so okrogle in se ločujejo od površine). Ker se te mitotične celice zlahka ločijo, se jih lahko ob odstranitvi gojišča s preskusno snovjo izgubi. Pri spiranju kultur se jih odvzame, nato pa vrne v kulture, pri čemer je treba paziti, da se v času odvzema ne izgubijo celice, pri katerih poteka mitotična delitev in pri katerih obstaja tveganje nastanka mikronukleusa.

Število kultur

47. Za vsako koncentracijo preskusne snovi ter kulture z nosilcem/topilom in kulture negativne kontrole se uporabita dve vzporedni kulturi. Kadar se na podlagi preteklih podatkov laboratorija lahko dokaže, da so razlike med dvema vzporednima kulturama minimalne, je sprejemljivo, da se uporabi ena kultura. Če se uporabi ena kultura, se priporoča, da se analizira večje število koncentracij.

Odvzem celic in priprava mikroskopskih preparatov

48. Vsaka kultura se odvzame in obdela ločeno. Priprava celic lahko vključuje hipotonično obdelavo, vendar to ni potrebno, če se ustrezno širjenje celic doseže tudi drugače. Pri pripravi mikroskopskih preparatov se lahko uporabijo različne tehnike, če se za štetje pridobi priprave s celicami visoke kakovosti. Zadržati je treba citoplazmo celic, kar omogoči odkrivanje mikronukleusov in (pri metodi s citokinetskim blokom) zanesljivo identifikacijo celic z dvema jedroma.
49. Mikroskopske preparate se lahko obarva z različnimi metodami, kot so Giemsa ali DNA-specifična fluorescentna barvila (59). Uporaba DNA-specifičnega barvila (npr. akridin oranž (61) ali Hoechst 33258 plus pyronin-Y (62)) lahko prepreči nastanek nekaterih artefaktov, povezanih z uporabo barvila, ki ni specifično za DNA. Za opredelitev vsebine (kromosom/kromosomski delec) mikronukleusov, če so potrebne mehanske informacije o njihovi tvorbi, se lahko uporabi kinetohorno protitelo, fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) s sondami DNA za centromere ali primarno označevanje *in situ* s premazi, specifičnimi za centromere, skupaj z ustreznim nasprotnim barvanjem DNA (15) (16). Za razlikovanje med snovmi, ki povzročajo strukturne in številčne poškodbe kromosomov (anevgeni in klastogeni), se lahko uporabijo druge metode, če so se izkazale za učinkovite.

Analiza

50. Vse preparate se, skupaj z vzorci s topilom/nosilcem in kontrolnimi vzorci, pred mikroskopsko analizo neodvisno kodira. Namesto tega se lahko kodirane vzorce analizira s pomočjo validiranega, avtomatiziranega sistema za pretočno citometrično analizo ali slikovno analizo.
51. Pri kulturah, tretiranih s citohalazinom B, je treba pogostost mikronukleusov analizirati v vsaj 2 000 celicah z dvema jedroma na koncentracijo (vsaj 1 000 celic z dvema jedroma na kulturo; dve kulturi na koncentracijo). Če se uporabi ena kultura, je treba iz te kulture oceniti vsaj 2 000 celic z dvema jedroma na koncentracijo. Če je za štetje pri vsaki koncentraciji uporabljenih precej manj kot 1 000 celic z dvema jedroma na kulturo ali 2 000 celic z dvema jedroma v primeru ene kulture in če ni ugotovljeno znatno povečanje števila mikronukleusov, je treba preskus ponoviti z več celicami ali z manj toksičnimi koncentracijami, kar je primernejše. Paziti je treba, da se ne šteje celic z dvema jedroma, ki so nepravilne oblike ali pri katerih se velikost dveh jeder precej razlikuje; prav tako se celic z dvema jedroma ne sme zamenjevati s slabo razširjenimi celicami z več jedri. Celice, ki imajo več kot dve glavni jedri, se ne analizirajo glede mikronukleusov, saj je lahko izhodiščna pogostost mikronukleusov v teh celicah višja (63) (64). Štetje celic z enim jedrom je sprejemljivo, če je za preskusno snov znano, da vpliva na delovanje citohalazina B.

52. V celičnih linijah, analiziranih brez tretiranja s citohalazinom B, se mikronukleuse šteje v vsaj 2 000 celicah na koncentracijo (vsaj 1 000 celic na kulturo; dve kulturi na koncentracijo). Če se uporabi samo eno kulturo na koncentracijo, se pri tej kulturi oceni vsaj 2 000 celic.
53. Ko je uporabljen citohalazin B, je treba za oceno množenja celic določiti CBPI ali RI (glej Dodatek 2) na podlagi vsaj 500 celic na kulturo. Kadar se tretiranje izvaja brez dodanega citohalazina B, je treba zagotoviti dokaz, da so se štete celice množile, kot je obravnavano v odstavkih 24–27.

Merila za sprejemljivost

54. Laboratorij, ki predlaga uporabo analize mikronukleusov *in vitro*, opisano v tej preskusni metodi, mora z uporabo referenčnih kemikalij iz Dodatka 3 dokazati svojo sposobnost, da zanesljivo in natančno odkrije kemikalije, za katere je znano, da povzročajo številčne in strukturne poškodbe kromosomov (anevgeno in klastogeno delovanje), z aktivacijo presnove in brez nje, pa tudi znane negativne kemikalije. Kot dokaz za zmožnost laboratorija, da pravilno izvede to preskusno metodo, mora laboratorij zagotoviti dokaze, da se je pri celicah, ki se jih šteje glede tvorbe mikronukleusov, zaključila ena delitev jedra, če se preskus izvaja brez uporabe citohalazina B.
55. Kemikalije iz Dodatka 3 se priporoča kot referenčne kemikalije. Lahko se vključi nadomestne ali dodatne kemikalije, če je njihovo delovanje znano, če spodbujajo tvorbo mikronukleusov z enakimi mehanizmi delovanja in če se zanje izkaže, da so pomembne v zvezi s kemikalijami, ki se bodo preskušale z uporabo postopka analize mikronukleusov *in vitro*. Utemeljitev bi lahko vključevala validacijsko študijo, pri kateri so uporabljene številne različne snovi, oziroma študijo, osredotočeno na ožji spekter, ki temelji na kemijskem razredu preskusne snovi ali mehanizmu škode, ki se preučuje.
56. Kontrolne kulture s topilom/nosilcem in netretirane kulture naj bi dale ponovljivo nizko in dosledno pogostost mikronukleusov (običajno 5–25 mikronukleusov/1 000 celic za vrste celic, opredeljene v odstavku 11). Druge vrste celic imajo lahko različne razpone odzivov, ki jih je treba določiti pri validaciji za uporabo pri analizi mikronukleusov *in vitro*. Za določitev preteklih kontrolnih razponov je treba uporabiti podatke, pridobljene z negativno kontrolo, kontrolo s topilom in pozitivno kontrolo. Te vrednosti se uporabijo pri odločanju o ustreznosti primerjalne negativne/pozitivne kontrole za poskus.
57. Če so za analizo predlagane manjše spremembe protokola (npr. avtomatizirano štetje namesto ročnih tehnik štetja; uporaba nove vrste celic), se pred sprejetjem spremenjenega protokola za uporabo najprej dokaže učinkovitost spremembe. Dokaz učinkovitosti vključuje dokaz, da se lahko odkrije glavne mehanizme preloma kromosomov in pridobitev ali izgubo ter da se lahko za razred posamezne snovi ali številnih različnih snovi, ki se bodo preskušale, pridobi ustrezne pozitivne in negativne rezultate.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

58. Če se uporabi tehnika citokinetskega bloka, se pri ocenjevanju nastajanja mikronukleusov uporabi samo pogostost celic z dvema jedroma z mikronukleusi (ne glede na število mikronukleusov na celico). Štetje celic z enim, dvema ali več mikronukleusi bi lahko zagotovilo koristne informacije, vendar ni obvezno.
59. Določiti je treba sočasne meritve citotoksičnosti in/ali citostaze za vse tretirane kulture in kontrolne kulture s topilom/nosilcem (58). Pri uporabi metode citokinetskega bloka je treba za vse tretirane in kontrolne kulture izračunati CBPI ali RI kot merili zakasnitve celičnega cikla. Če citohalazin B ni dodan, se uporabi relativna podvojitev populacije (RPD) ali relativno povečanje števila celic (RICC) ali indeks množenja (glej Dodatek 2).
60. Navedejo se podatki za posamezne kulture. Poleg tega se podatki povzamejo v obliki preglednice.
61. Kemikalije lahko pri analizi mikronukleusov *in vitro* povzročijo nastanek mikronukleusov zato, ker povzročajo prelom kromosomov, izgubo kromosomov ali pa oboje hkrati. Za ugotovitev, ali je mehanizem za nastajanje mikronukleusov posledica delovanja, ki povzroča strukturne in številčne poškodbe kromosomov (klastogenega in/ali anevgenega delovanja), se lahko izvede nadaljnja analiza z uporabo antikinetohornih protiteles, *in situ* sond, specifičnih za centromere, ali drugih metod.

Vrednotenje in razlaga rezultatov

62. Ni zahteve po potrjevanju jasnega pozitivnega ali negativnega odziva z dodatnimi preskusi. Dvoumni rezultati se lahko pojasnijo z analizo dodatnih 1 000 celic iz vseh kultur, zaradi česar ne pride do izgube slepih vzorcev. Če ta pristop ne pomaga pri spremembi rezultata, je treba izvesti nadaljnje preskušanje. V nadaljnjih poskusih naj se preuči možnost prilagoditve razširjenega ali zožanega razpona preskusnih parametrov, kot je primerno. Preskusni parametri, ki se lahko spremenijo, vključujejo razmik med preskusnimi koncentracijami, časovno razporeditev obdelave in odvzema celic in/ali pogoje za aktivacijo presnove.

63. Pozitivni rezultat se lahko določi na podlagi številnih meril, kot je na primer s koncentracijo povezano povečanje ali statistično značilno povečanje števila celic z mikronukleusi. Najprej naj se preuči biološka pomembnost rezultatov. Upoštevanje tega, ali so dobljene vrednosti v razponu preteklih kontrol ali zunaj njega, lahko zagotovi smernice pri ocenjevanju biološke pomembnosti odziva. Pri vrednotenju rezultatov preskusa se kot pomoč lahko uporabijo ustrezne statistične metode (65). Vendar je treba rezultate statističnega preskušanja oceniti z upoštevanjem odnosa med odmerkom in odzivom. Upoštevati je treba tudi ponovljivost in pretekle podatke.
64. Čeprav bo večina poskusov dala jasne pozitivne ali negativne rezultate, bodo v nekaterih primerih dobljeni podatki preprečili zanesljivo oceno o delovanju preskusne snovi. Ti dvomni ali dvomljivi odzivi se lahko pojavijo ne glede na število ponovitev poskusa.
65. Pozitivni rezultati analize mikronukleusov *in vitro* pomenijo, da v kultiviranih celicah sesalcev preskusna snov povzroča prelome ali izgubo kromosomov. Negativni rezultati pomenijo, da preskusna snov pri uporabljenih preskusnih pogojih ne povzroča preloma kromosomov in/ali pridobitve ali izgube v uporabljenih kultiviranih sesalskih celicah.

Poročilo o preskusu

66. Poročilu o preskusu vsebuje vsaj naslednje informacije (če so pomembne za izvedbo študije):

Preskusna kemikalija:

- identifikacijske podatke in registrsko številko Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov ter številko EC,
- agregatno stanje in čistost,
- fizikalno-kemijske lastnosti, pomembne za izvedbo študije,
- reagiranje preskusne kemikalije s topilom/nosilcem ali gojiščem celic;

Topilo/nosilec:

- utemeljitev izbire topila/nosilca,
- topnost in stabilnost preskusne snovi v topilu/nosilcu;

Celice:

- vrsto in izvor uporabljenih celic,
- ustreznost uporabljene vrste celic,
- odsotnost mikoplazme, če je to primerno,
- informacije o trajanju celičnega cikla, podvojitvenem času ali indeksu množenja,
- kadar so uporabljeni limfociti, spol, starost in število donatorjev krvi, če je primerno,
- kadar so uporabljeni limfociti, ali je izpostavljena kri v celoti ali ločeni limfociti,
- število pasaž, če je primerno,
- metode vzdrževanja celičnih kultur, če je primerno,
- modalno število kromosomov,
- običajno (negativna kontrola) trajanje celičnega cikla;

Preskusni pogoji:

- identiteto citogenetskega bloka (npr. cytoB), če je uporabljen, njegovo koncentracijo in trajanje izpostavljenosti celic,
- razloge za izbiro koncentracij in števila kultur, vključno s podatki o citotoksičnosti in mejah topnosti, če so na voljo,

- sestavo gojišč, koncentracijo CO₂, če je primerno,
- koncentracije preskusne snovi,
- koncentracije (in/ali volumen) nosilca in dodane preskusne snovi,
- inkubacijsko temperaturo in čas trajanja inkubacije,
- trajanje obdelave,
- odvzem po obdelavi,
- gostoto celic ob nasaditvi, če je primerno,
- vrsto in sestavo sistema za aktivacijo presnove, skupaj z merili za sprejemljivost,
- kemikalije pozitivne kontrole in negativne kontrole,
- metode priprave mikroskopskih preparatov in uporabljene tehnike barvanja,
- merila za identifikacijo mikronukleusov,
- števila analiziranih celic,
- metode merjenja citotoksičnosti,
- morebitne dodatne informacije v zvezi s citotoksičnostjo,
- merila za določanje študij kot pozitivnih, negativnih ali dvoumnih,
- uporabljene metode statistične analize,
- metode, kot je uporaba kinetohornega protitelesa, za ugotavljanje, ali mikronukleusi vsebujejo cele kromosome ali le delce kromosomov, če je primerno;

Rezultati:

- meritev uporabljene citotoksičnosti, npr. CBPI ali RI v primeru metode citokinetskega bloka; RICC, RPD ali PI v primerih, ko metode citokinetskega bloka niso uporabljene; druge ugotovitve, če je primerno, npr. konfluentnost celic, apoptozo, nekrozo, štetje v metafazi, pogostost celic z dvema jedroma,
- znake obarjanja,
- podatke o pH in osmolarnosti obdelovalnega gojišča, če sta bila določena,
- opredelitev sprejemljivih celic za analizo,
- porazdelitev celic z enim, dvema ali več jedri v primeru uporabe metode citokinetskega bloka,
- število celic z mikronukleusom, podanih ločeno za vsako tretirano in kontrolno kulturo, ter po potrebi opredelitev, ali so iz celic z dvema ali enim jedrom,
- odvisnost med koncentracijo in odzivom, kadar je mogoče,
- kemijske podatke o primerjalni negativni (topilo/nosilec) in pozitivni kontroli (koncentracije in topila),
- pretekle kemijske podatke o negativni (topilo/nosilec) in pozitivni kontroli, skupaj z razponi, povprečji in standardnim odstopanjem ter intervalom zaupanja (npr. 95 %),
- statistično analizo; p-vrednosti, če obstajajo;

Razprava o rezultatih

Sklepi

VIRI

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, *Mutagenesis*, 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, *Mutagenesis*, 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, *Mutagenesis*, 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 Test*, Test Guideline No. 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Na voljo na spletni strani: 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), *Mutagenesis*, 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. ESAC 25th meeting, 16-17 November, 2006, na voljo na spletni strani: <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, na voljo na spletni strani: <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), *Mutagenesis*, 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, *Mutagenesis*, 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 genotoxins; current state of knowledge, *Toxicol.*, 198, 315–328.
38. Gibson, D.P., Brauninger, 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, str. 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), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Na voljo na spletni strani: <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, *Mutagenesis*, 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, v: Tice, R.R., Costa, D.L. and Schaich, K.M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, str. 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., Surrallés, 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. Surrallés, 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, v: Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, str. 463–467.
66. Uredba (ES) št. 850/2004 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 29. aprila 2004 o obstojnih organskih onesnaževalih in spremembi Direktive 79/117/EGS (UL L 229, 30.4.2004, str. 5).

Dodatek 1

Opredelitve pojmov

Aneugen: snov ali proces, na podlagi katerega pride do aneuploidije v celicah ali organizmih zaradi reagiranja z elementi mitotičnega in meiotičnega cikla delitve celic (angl. 'aneugen', op. prev.).

Aneuploidija: odstopanje od normalnega diploidnega (ali haploidnega) števila kromosomov z enim kromosomom ali več kot enim kromosomom, vendar ne s celotno skupino ali skupinami kromosomov (poliploidija).

Apoptoza: programirana celična smrt, za katero je značilna vrsta korakov, ki vodijo k razgradnji celic v delce, vezane na membrano, ki se nato odstranijo s fagocitozo ali osipanjem.

Množenje celic: povečanje števila celic zaradi mitotične delitve celic.

Centromera: mesto na kromosomu, kjer sta spojeni obe kromatidi in na katerem sta na obeh straneh pritrjeni obe kinetohori.

Klastogen: snov ali proces, ki v populacijah celic ali organizmih povzroča strukturne poškodbe kromosomov (angl. 'clastogen', op. prev.).

Citokineza: proces delitve celic, ki sledi takoj po mitozu in vpliva na oblikovanje dveh hčerinskih celic, ki imata vsaka eno samo jedro.

Indeks množenja citokinetskega bloka (CBPI): delež celic, pri katerih se je izvedla druga delitev, v tretirani populaciji glede na netretirano kontrolo (glej Dodatek 2 za formulo).

Citostaza: zaviranje rasti celic (glej Dodatek 2 za formulo).

Citotoksičnost: škodljivi učinki na celično strukturo ali delovanje, ki na koncu povzročijo smrt celice.

Genotoksično: splošni izraz, ki zajema vse poškodbe DNA ali kromosomov, vključno s prelomi, prerazporeditvijo aduktov, mutacijami, aberacijami kromosomov in aneuploidijo. Vsi genotoksični učinki ne vplivajo na nastanek mutacij ali trajno poškodbo kromosomov.

Interfazne celice: celice, ki niso v fazi mitoze.

Kinetohora: struktura s proteinom, ki nastane na centromeri kromosoma in na katero se pripnejo niti delitvenega vretena med delitvijo celice, kar omogoča pravilno gibanje hčerinskih kromosomov proti poloma hčerinskih celic.

Mikronukleusi: majhna jedra, poleg glavnega jedra celic in ločena od njega, ki nastanejo med telofazo mitoze ali mejoze iz zaostalih fragmentov kromosomov ali celih kromosomov.

Mitoza: delitev celičnega jedra, ki je običajno razdeljena na profazo, prometafazo, metafazo, anafazo in telofazo.

Mitotični indeks: razmerje med številom celic v metafazi in skupnim številom celic v opazovani populaciji celic; pokazatelj stopnje množenja celic te populacije.

Mutageno: povzroči dedno spremembo zaporedij baznih parov DNA v genih ali strukturi kromosomov (kromosomske aberacije).

Nerazdvajanje: par kromatid se ne razdvoji in ustrezno loči v razvijajoče se hčerinske celice, zaradi česar imata hčerinski celici nenormalno število kromosomov.

Poliploidija: številčne kromosomske aberacije v celicah ali organizmih, ki ne vplivajo na posamezen kromosom ali kromosome (aneuploidija), ampak na vse kromosome.

Indeks množenja (PI): metoda za merjenje citotoksičnosti v primerih, ko citohalazin B ni dodan (glej Dodatek 2 za formulo).

Relativno povečanje števila celic (RICC): metoda za merjenje citotoksičnosti v primerih, ko citohalazin B ni dodan (glej Dodatek 2 za formulo).

Relativna podvojitve populacije (RPD): metoda za merjenje citotoksičnosti v primerih, ko citohalazin B ni dodan (glej Dodatek 2 za formulo).

Indeks pomnoževanja (RI): razmerje ciklov celične delitve v tretirani kulturi glede na netretirano kulturo, med obdobjem izpostavljenosti in obnavljanja (glej Dodatek 2 za formulo).

Preskusna kemikalija (imenovana tudi preskusna snov): katera koli snov ali zmes, preskušana z uporabo te preskusne metode.

Dodatek 2

Formule za ocenjevanje citotoksičnosti

1. Ko je uporabljen citohalazin B, ocena citotoksičnosti temelji na indeksu množenja citokinetkega bloka (CBPI) ali indeksu pomnoževanja (RI) (16) (58). CBPI kaže povprečno število celičnih ciklov na celico med obdobjem izpostavljenosti citohalazinu B in se lahko uporabi za izračun množenja celic. RI kaže relativno število jeder v tretiranih kulturah v primerjavi s kontrolnimi kulturami in se lahko uporabi za izračun % citostaze:

$$\% \text{ citostaze} = 100 - 100 \{ (CBPI_T - 1) \div (CBPI_C - 1) \}$$

in:

T = kultura, tretirana s preskusno kemikalijo

C = kontrolna kultura z nosilcem

pri čemer je:

$$CBPI = \frac{((\text{št. celic z enim jedrom}) + (2 \times \text{št. celic z dvema jedroma}) + (3 \times \text{št. celic z enim jedrom}))}{(\text{skupno število celic})}$$

Tako je CPBI z vrednostjo 1 (vse celice imajo eno jedro) enak 100-odstotni citostazi.

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

$$RI = \frac{((\text{št. celic z dvema jedroma}) + (2 \times \text{št. celic z več jedri})) \div (\text{skupno število celic})_T}{((\text{št. celic z dvema jedroma}) + (2 \times \text{št. celic z več jedri})) \div (\text{skupno število celic})_C} \times 100$$

T = tretirane kulture

C = kontrolne kulture

2. Zato RI s 53 % pomeni, da se je v primerjavi s številom celic, ki so se delile v kontrolni kulturi in oblikovale celice z dvema jedroma in več jedri, v tretirani kulturi delilo samo 53 % tega števila celic, tj. 47-odstotna citostaza.

3. Ko citohalazin B ni uporabljen, se priporoča ocena citotoksičnosti na podlagi relativnega povečanja števila celic (RICC) ali relativne podvojitve populacije (RPD) (58), saj obe metodi upoštevata delež celične populacije, ki se je delil.

$$RICC = \frac{(\text{povečanje števila celic v tretiranih kulturah (končno – začetno)})}{(\text{povečanje števila celic v kontrolnih kulturah (končno – začetno)})} \times 100$$

$$RPD = \frac{(\text{št. podvajanj populacije v tretiranih kulturah})}{(\text{št. podvajanj populacije v kontrolnih kulturah})} \times 100$$

pri čemer je:

$$\text{podvajanje populacije} = [\log (\text{število celic po obdelavi} \div \text{prvotno število celic})] \div \log 2$$

4. Zato RICC ali RPD s 53 % kaže na 47-odstotno citotoksičnost/citostazo.

5. Z uporabo indeksa množenja (PI) se lahko citotoksičnost oceni s pomočjo štetja števila klonov, ki jih sestavljajo 1 celica (cl1), 2 celici (cl2), 3 do 4 celice (cl4) in 5 do 8 celic (cl8).

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

6. PI se kot koristen in zanesljiv parameter citotoksičnosti uporablja tudi za celične linije, kultivirane *in situ* brez dodanega citohalazina B (25) (26) (27) (28).

Dodatek 3

Referenčne kemikalije, priporočene za ocenjevanje učinkovitosti ⁽¹⁾

Kategorija	Kemikalija	št. CAS	Št. EC
1. Klastogeni, aktivni brez aktivacije presnove			
	Citozin-arabinozid	147-94-4	205-705-9
	Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
2. Klastogeni, ki zahtevajo aktivacijo presnove			
	Benzo(a)piren	50-32-8	200-028-5
	Ciklofosamid	50-18-0	200-015-4
3. Anevgeni			
	Kolhicin	64-86-8	200-598-5
	Vinblastin	143-67-9	205-606-0
4. Negativne snovi			
	Di(2-etilheksil)ftalat	117-81-7	204-211-0
	Nalidinska kislina	389-08-2	206-864-7
	Piren	129-00-0	204-927-3
	Natrijev klorid	7647-14-5	231-598-3

⁽¹⁾ Referenčne kemikalije so kemikalije, priporočene za uporabo. Nadomestne ali dodatne kemikalije se lahko dodajo na seznam referenčnih kemikalij, če je njihovo delovanje znano, če spodbujajo tvorbo mikronukleusov z enakimi mehanizmi delovanja in če se zanje izkaže, da so pomembne v zvezi s kemikalijami, ki se bodo preskušale z uporabo postopka analize mikronukleusov *in vitro*. Odvisno od namena bi lahko utemeljitev obsegala validacijsko študijo, pri kateri so uporabljene številne različne snovi, oziroma študijo, osredotočeno na ožji spekter, ki temelji na kemijskem razredu preskusne snovi ali mehanizmu škode, ki se ga preučuje.

B.50. PREOBČUTLJIVOST KOŽE: LOKALNA ANALIZA BEZGAVK: DA

UVOD

- Smernice OECD za preskušanje kemikalij in preskusne metode EU se redno preverjajo zaradi znanstvenega napredka, spreminjajočih se zakonodajnih potreb in vprašanj, povezanih z dobrim počutjem živali. Prva preskusna metoda (B.42) za določanje preobčutljivosti kože pri miši, lokalna analiza bezgavk (LLNA; Smernica za preskušanje OECD 429) je bila že preverjena (1). Objavljene so podrobnosti o validaciji LLNA in pregled s tem povezanega dela (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Pri LLNA se za merjenje množenja limfocitov uporablja radioizotopni timidin ali jod, zato je lahko uporaba analize omejena v primerih, kjer je pridobitev, uporaba ali odstranitev radioaktivnosti težavna. LLNA, DA (razvil jo je Daicel Chemical Industries, Ltd) je neradioaktivna različica LLNA, ki količinsko opredeljuje vsebnost adenozin-trifosfata (ATP) s pomočjo bioluminescence kot pokazatelja množenja limfocitov. Preskusno metodo LLNA: DA je validirala in pregledala mednarodna strokovna skupina za ocenjevanje ter jo priporočila kot koristno za opredelitev kemikalij, ki povzročajo preobčutljivost, in kemikalij, ki je ne povzročajo, z nekaterimi omejitvami (10) (11) (12) (13). Ta preskusna metoda je zasnovana za ocenjevanje morebitne preobčutljivosti kože s kemikalijami (snovmi in zmesmi) pri živalih. Poglavje B.6 te priloge in Smernica za preskušanje OECD 406 uporabljata preskuse na morskih prašičkih, predvsem maksimizacijski in Buehlerjev preskus na morskih prašičkih (14). LLNA (poglavje B.42 te priloge; Smernica za preskušanje OECD 429) in dve spremembi, pri katerih se radioaktivnost ne uporablja, analiza LLNA: DA (poglavje B.50 te priloge; Smernica za preskušanje OECD 442 A) in LLNA: BrdU-ELISA (poglavje B.51 te priloge; Smernica za preskušanje OECD 442 B) zaradi manj pogoste in izpopolnjene uporabe živali zagotavljajo prednost v primerjavi s preskusi na morskih prašičkih iz metode B.6 in Smernica za preskušanje OECD 406 (14).
- Podobno kot LLNA tudi LLNA: DA preučuje induksijsko fazo preobčutljivosti kože in zagotavlja količinske podatke, ki so primerni za oceno odziva na odmere. Ker odkriva povzročitelje preobčutljivosti, ne da bi bilo pri tem treba uporabiti radioaktivni označevalec za DNA, se ne pojavljajo vprašanja glede poklicne izpostavljenosti radioaktivnosti in odstranjevanja odpadkov. Zaradi tega bo za odkrivanje povzročiteljev preobčutljivosti morda mogoča pogostejša uporaba miši, zaradi česar bi se lahko še bolj zmanjšala uporaba morskih prašičkov za preskušanje morebitne preobčutljivosti kože (tj. B.6; Smernica za preskušanje OECD 406) (14).

OPREDELITVE POJMOV

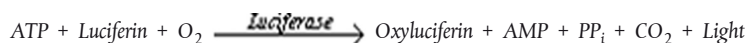
- Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI POMISLEKI IN OMEJITVE

4. Analiza LLNA: DA je spremenjena metoda LLNA za ugotavljanje morebitne preobčutljivosti kože s kemikalijami, s posebnimi omejitvami. Ni nujno, da to pomeni, da je treba v vseh primerih namesto preskusov na morskih prašičkih in LLNA (tj. B.6; Smernica za preskušanje OECD 406) (14), uporabiti analizo LLNA: DA, temveč da je ta analiza enakovredna in se lahko uporabi kot druga možnost, pri kateri običajno niso več potrebne dodatne potrditve pozitivnih in negativnih rezultatov (10) (11). Preskuševalni laboratorij mora pred začetkom opravljanja študije upoštevati vse razpoložljive informacije o preskusni snovi. Takšne informacije bodo vključevale vrsto in kemijsko sestavo preskusne snovi; njene fizikalno-kemijske lastnosti; rezultate katerih koli drugih preskusov toksičnosti na preskusni snovi, *in vitro* ali *in vivo*; in toksikološke podatke o strukturno sorodnih kemikalijah. Te informacije je treba upoštevati, da se določi, ali je metoda LLNA: DA primerna za preskusno snov (glede na nezdruljivost omejenega števila vrst kemikalij z analizo LLNA: DA [glej odstavke 5] in za lažjo izbiro odmerka.
5. Analiza LLNA: DA je metoda *in vivo* in posledično ne odpravlja uporabe živali pri ocenjevanju delovanj, ki povzročajo alergijsko preobčutljivost ob stiku. Vendar ima možnost, da v primerjavi s preskusi na morskih prašičkih (B.6; Smernica za preskušanje OECD 406) (14) zmanjša število živali, potrebnih v ta namen. Poleg tega nudi analiza LLNA: DA znatno izboljšanje (manj bolečine in trpljenja) načina, kako se živali uporabljajo za preskušanje alergijske preobčutljivosti ob stiku, saj v nasprotju z metodo B.6 in Smernico za preskušanje 406 ne zahteva, da se povzročijo izzvane reakcije prekomerne občutljivosti kože. Kljub prednostim analize LLNA: DA v primerjavi z metodo B.6 in Smernico za preskušanje OECD 406 (14), obstajajo nekatere omejitve, zaradi katerih je lahko nujna uporaba metode B.6 ali Smernice za preskušanje OECD 406 (npr. preskušanje določenih kovin, lažni pozitivni rezultati pri nekaterih dražilnih snoveh za kožo [kot so nekatere vrste površinsko razgradljivih kemikalij] (6) (1 in poglavje B.42 te priloge), topnost preskusne snovi). Poleg tega je zaradi kemijskih razredov ali snovi s funkcionalnimi skupinami, za katere se je izkazalo, da lahko delujejo kot moteči dejavniki (16), lahko potrebna uporaba preskusov na morskih prašičkih (tj. B.6; Smernica za preskušanje OECD 406 (14)). Za omejitve, določene za LLNA (1 in poglavje B.42 te priloge), je bilo priporočeno, da se uporabljajo tudi za analizo LLNA: DA (10). Poleg tega uporaba analize LLNA: DA morda ni primerna za uporabo snovi, ki vplivajo na ravni adenozintrifosfata (ATP) (npr. snovi, ki delujejo kot inhibitorji ATP), ali snovi, ki vplivajo na natančno merjenje ATP v celicah (npr. prisotnost encimov, ki razgrajujejo ATP, prisotnost zunajcelične ATP v bezgavki). Razen takšnih določenih omejitev bi morala biti analiza LLNA: DA primerna za preskušanje katere koli snovi, razen če so s temi snovmi povezane lastnosti, ki lahko ovirajo natančnost analize LLNA: DA. Poleg tega je treba razmisliti o možnosti mejnih pozitivnih rezultatov v primerih, ko so dobljene vrednosti stimulacijskega indeksa (SI) med 1,8 in 2,5 (glej odstavke 31–32). To temelji na podatkovni zbirki za validacijo s 44 snovmi s stimulacijskim indeksom $\geq 1,8$ (glej odstavek 6), pri kateri je analiza LLNA: DA pravilno opredelila vseh 32 povzročiteljev preobčutljivosti pri LLNA, vendar je nepravilno opredelila tri od 12 snovi, ki pri LLNA ne povzročajo preobčutljivosti z vrednostmi stimulacijskega indeksa med 1,8 in 2,5 (tj. mejno pozitivna vrednost) (10). Ker pa je bil za določanje vrednosti stimulacijskega indeksa in izračun predvidljivih lastnosti preskusa uporabljen isti nabor podatkov, so lahko navedeni rezultati pretirana ocena dejanskih predvidljivih lastnosti.

NAČELA METODE PRESKUŠANJA

6. Osnovno načelo, na katerem temelji analiza LLNA: DA, je, da povzročitelji preobčutljivosti povzročijo množenje limfocitov v bezgavkah, ki drenirajo območje nanosa preskusne snovi. To množenje je sorazmerno z odmerkom in močjo uporabljenega alergena in je preprosto sredstvo za doseganje količinske izmere preobčutljivosti. Množenje se izmeri s primerjavo povprečnega množenja v vsaki preskusni skupini in povprečnega množenja v kontrolni skupini, tretirani z nosilcem. Določi se razmerje med povprečnim množenjem v vsaki tretirani skupini in povprečnim množenjem v primerjalni kontrolni skupini z nosilcem, ki se imenuje stimulacijski indeks (SI) in mora biti $\geq 1,8$, preden je nadaljnje ocenjevanje preskusne snovi kot možnega povzročitelja preobčutljivosti kože utemeljeno. Opisani postopki temeljijo na merjenju vsebnosti ATP z bioluminiscenco (za katero je znano, da se ujema s številom živih celic) (17), ki pokaže povečano število množecih se celic v ušesnih bezgavkah (18) (19). Metoda z bioluminiscenco izkorišča encim luciferaze za kataliziranje nastanka svetlobe iz ATP in luciferin v skladu z naslednjo reakcijo:



Oddana osvetljenost je linearno povezana s koncentracijo ATP in se meri z luminometrom. Analiza reakcije med luciferinom in luciferazo je občutljiva metoda za količinsko opredelitev ATP, ki se uporablja na številne načine (20).

OPIS ANALIZE

Izbira živalskih vrst

7. Izbrana vrsta za ta preskus je miš. Validacijske študije za analizo LLNA: DA so bile izvedene samo s sevom CBA/J, ki je zato priporočeni sev (12) (13). Uporabijo se mlade odrasle miške samice, ki še niso kotile in niso breje. Na začetku študije morajo biti živali stare 8–12 tednov, odstopanje mase živali pa mora biti čim manjše in ne sme presegati 20 % povprečne mase. Namesto tega se lahko uporabi druge seve in samce, ko je dobljenih dovolj podatkov za prikaz, da ne obstajajo značilne razlike v odzivu pri analizi LLNA: DA glede na sev in/ali spol.

Bivalni in prehranjevalni pogoji

8. Miši morajo biti skupinsko nastanjene (21), razen če je zagotovljena ustrezna znanstvena utemeljitev za njihovo ločeno nastanitev. Temperatura v prostoru za poskusne živali mora biti $22 \pm 3^\circ\text{C}$. Čeprav mora biti relativna vlažnost najmanj 30 % in po možnosti ne sme presežati 70 %, mora biti ciljna vlažnost, razen med čiščenjem prostora, 50 do 60 %. Osvetlitev naj bo umetna, in sicer 12 ur svetlobe, 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja konvencionalna laboratorijska prehrana z neomejeno oskrbo s pitno vodo.

Priprava živali

9. Živali se naključno izberejo, označijo tako, da je omogočeno posamično prepoznavanje (vendar ne s katero od oblik ušesnih oznak), in zadržijo v kletkah najmanj pet dni pred začetkom dajanja odmerka, da se lahko prilagodijo laboratorijskim razmeram. Pred začetkom tretiranja se vse živali pregledajo, da se zagotovi, da nimajo opaznih kožnih lezij.

Priprava preskusnih raztopin

10. Trdne kemikalije se pred nanosom na uho miši raztopijo ali suspendirajo v ustreznih topilih ali nosilcih in po potrebi razredčijo. Tekoče kemikalije se lahko nanesejo nerazredčene ali pa se razredčijo pred dajanjem odmerka. Pri netopnih kemikalijah, kot so tiste, ki se običajno uporabljajo v medicinskih pripomočkih, je treba uporabiti močno povečano ekstrakcijo v ustreznem topilu, da se odkrije vse ekstraktibilne sestavine za preskušanje pred nanosom na uho miši. Preskusne snovi je treba pripravljati dnevno, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

Preverjanje zanesljivosti

11. Za prikaz ustrezne učinkovitosti analize se uporabijo kemikalije pozitivne kontrole, ki se odzovejo z ustrezno in ponovljivo občutljivostjo kot preskusna snov, ki povzroča preobčutljivost, za katero je stopnja reakcije natančno opredeljena. Uporaba primerjalne pozitivne kontrole je priporočena, saj pokaže zmožnost laboratorija, da uspešno izvede vsako analizo, ter omogoča ocenjevanje ponovljivosti in primerljivosti v enem ali več laboratorijih. Tudi nekateri regulativni organi zahtevajo uporabo pozitivne kontrole pri vsaki raziskavi, zato se uporabnikom priporoča, da se pred izvedbo analize LLNA: DA posvetujejo s pristojnimi organi. V skladu s tem se priporoča redna uporaba primerjalne pozitivne kontrole, saj tako ni potrebno dodatno preskušanje na živalih za izpolnitev zahtev, ki se lahko pojavijo zaradi uporabe redne pozitivne kontrole (glej odstavek 12). Pozitivna kontrola mora povzročiti pozitiven odziv analize LLNA: DA na raven izpostavljenosti, za katero se pričakuje, da bo dala večji stimulacijski indeks (SI) $> 1,8$ kot negativna kontrolna skupina. Odmerek pozitivne kontrole je treba izbrati tako, da ne povzroči čezmernega draženja kože ali sistemske toksičnosti in da je indukcija ponovljiva, vendar ne čezmerna (tj. SI > 10 bi se štel za čezmernega). Priporočena pozitivna kontrola je 25-odstotni heksil cimetov aldehyd (Služba za izmenjavo kemijskih izvlečkov [CAS] št. 101-86-0) in 25-odstotni evgenol (št. CAS 97-53-0) v acetonu: olivnem olju (4:1, v/v). V nekaterih okoliščinah se lahko ob ustrezni utemeljitvi uporabijo druge pozitivne kontrole, ki izpolnjujejo zgornja merila.
12. Običajno je uporaba pozitivne kontrolne skupine priporočena, lahko pa obstajajo okoliščine, v katerih redno preskušanje (tj. v razmiku ≤ 6 mesecev) pozitivne kontrole morda zadošča za laboratorije, ki redno izvajajo analizo LLNA: DA (tj. izvajajo analizo LLNA: DA vsaj enkrat mesečno) in imajo vzpostavljeno zbirko podatkov o preteklih pozitivnih kontrolah, ki dokazujejo zmožnost laboratorija, da pridobi ponovljive in natančne rezultate s pozitivnimi kontrolami. Ustrezna strokovnost pri izvajanju analize LLNA: DA se lahko uspešno dokaže z dobivanjem doslednih pozitivnih rezultatov s pozitivno kontrolo pri vsaj desetih neodvisnih preskusih, izvedenih v razumnem časovnem obdobju (tj. v manj kot enem letu).
13. Primerjalno pozitivno kontrolno skupino je treba vključiti vedno, kadar pride do postopkovne spremembe pri analizi LLNA: DA (tj. zamenjava usposobljenega osebja, zamenjava materiala za preskusno metodo in/ali reagentov, zamenjava opreme za preskusno metodo, zamenjava vira preskusnih živali), takšne spremembe pa je treba vedno zabeležiti v laboratorijskih poročilih. Pri odločanju o nujnosti vzpostavitve nove zbirke preteklih podatkov za beleženje doslednosti pri rezultatih pozitivne kontrole je treba upoštevati učinek, ki ga imajo te spremembe na ustreznost predhodno vzpostavljene zbirke preteklih podatkov.
14. Raziskovalci se morajo zavedati, da odločitev o izvajanju redne namesto primerjalne pozitivne kontrolne študije vpliva na ustreznost in sprejemljivost negativnih rezultatov študije, pridobljenih brez primerjalne pozitivne kontrole v razmiku med rednimi pozitivnimi kontrolnimi študijami. Na primer, če je rezultat, pridobljen z redno pozitivno kontrolno študijo, lažno negativen, so lahko vprašljivi negativni rezultati preskusne snovi, pridobljeni v času med zadnjo sprejemljivo redno pozitivno kontrolno študijo in nesprejemljivo redno pozitivno kontrolno študijo. Pri odločanju, ali vključiti primerjalne pozitivne kontrole ali izvajati samo redne pozitivne kontrole, je treba skrbno preučiti posledice teh rezultatov. Treba je razmisliti tudi o uporabi manjšega števila živali v primerjalni pozitivni kontrolni skupini, če je to znanstveno utemeljeno in če laboratorij na podlagi preteklih podatkov, značilnih za laboratorij, dokaže, da se lahko uporabi manjše število miši (22).

15. Čeprav je treba pozitivno kontrolo preskusiti v nosilcu, za katerega je znano, da povzroča dosleden odziv (npr. aceton: olivno olje; 4:1, v/v), lahko obstajajo nekatere zakonodajne okoliščine, ko je potrebno tudi preskušanje v nestandardnem nosilcu (klinično/kemično ustrezne sestave) (23). Če se primerjalna pozitivna kontrola preskuša v drugem nosilcu kot preskusna snov, je treba za primerjalno pozitivno kontrolo vključiti ločen kontrolni nosilec.
16. V primerih, kjer se ocenjujejo snovi za poseben kemijski razred ali razpon reakcij, so lahko primerjalne snovi uporabne tudi za dokaz, da preskusna metoda deluje pravilno za odkrivanje morebitne preobčutljivosti kože pri teh vrstah snovi. Ustrezne primerjalne snovi morajo imeti naslednje lastnosti:
- strukturno in funkcijsko podobnost z razredom preskusne snovi, ki se preskuša,
 - znane fizikalno-kemijske lastnosti;
 - podporne podatke iz analiz LLNA: DA;
 - podporne podatke od drugih živalskih modelov in/ali ljudi.

PRESKUSNI POSTOPEK

Število živali in velikost odmerkov

17. Na skupino odmerka se uporabijo najmanj štiri živali z najmanj tremi koncentracijami preskusne snovi, poleg tega pa še primerjalna negativna kontrolna skupina, tretirana zgolj z nosilcem za preskusno snov, in pozitivna kontrola (primerjalna ali izvedena pred kratkim, odvisno od politike laboratorija pri upoštevanju odstavkov 11–15). Treba je razmisliti o preskušanju več odmerkov pozitivne kontrole, zlasti če se pozitivna kontrola preskuša občasno. Živali v kontrolnih skupinah je treba, razen če se ne tretirajo s preskusno snovjo, obravnavati in tretirati na enak način kot živali v tretiranih skupinah.
18. Izbira odmerka in nosilca mora temeljiti na priporočilih iz sklicev (2) in (24). Zaporedni odmerki se običajno izberejo iz ustrezne serije koncentracij, kot so 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % itd. Izbira uporabljene serije koncentracij mora biti ustrezno znanstveno utemeljena. Kadar so na voljo, je treba pri izbiri treh zaporednih koncentracij upoštevati vse obstoječe toksikološke informacije (npr. akutno toksičnost in draženje kože) ter strukturne in fizikalno-kemijske informacije o želeni preskusni snovi (in/ali strukturno povezani snovi), tako da je pri največji koncentraciji izpostavljenost največja, hkrati pa ni sistemske toksičnosti in/ali čezmernega draženja kože (24) (25). Če takšne informacije niso na voljo, je morda najprej potreben predhodni presejalni preskus (glej odstavke 21–24).
19. Nosilec ne sme ovirati rezultatov preskusa ali vplivati nanje, izbere pa se na podlagi povečevanja topnosti, da se med pripravljanjem raztopine/suspenzije, ki je primerna za uporabo preskusne snovi, pridobi največjo možno koncentracijo. Priporočljivi nosilci so aceton: olivno olje (4:1, v/v), N,N-dimetilformamid, metil etil keton, propilen glikol in dimetil sulfoksid (6), vendar se lahko uporabljajo tudi drugi, če je zagotovljena ustrezna znanstvena utemeljitev. V nekaterih okoliščinah je morda treba kot dodatno kontrolo uporabiti klinično ustrezno topilo ali trgovsko sestavo, v kateri se trži preskusna snov. Paziti je treba zlasti, da so v nosilni sistem vključene hidrofilne snovi, ki vlažijo kožo in se ne izsušijo takoj, z vključitvijo ustreznih pospeševalcev raztapljanja (npr. 1-odstotnim Pluronic® L92). Zato se je treba izogibati povsem vodenim nosilcem.
20. Obdelava bezgavk posamezne miši omogoča oceno spremenljivosti med posameznimi živalmi ter statistično primerjavo razlik med meritvami preskusne snovi in primerjalne kontrolne skupine z nosilcem (glej odstavek 33). Poleg tega je ocena možnosti zmanjšanja števila miši v pozitivni kontrolni skupini izvedljiva samo, če se zbirajo podatki o posameznih živalih (22). Poleg tega nekateri regulativni organi zahtevajo zbiranje podatkov o posameznih živalih. Redno zbiranje podatkov o posameznih živalih zagotavlja prednosti glede dobrega počutja živali, saj se s tem prepreči dvojno preskušanje, ki bi bilo potrebno, če bi bilo treba rezultate, prvotno zbrane na en način (npr. preko združenih podatkov o živalih) zaradi drugih zahtev regulativnih organov (npr. glede podatkov o posameznih živalih) kasneje ponovno preučiti.

Predhodni presejalni preskus

21. Če informacije za določitev največjega odmerka za preskušanje niso na voljo (glej odstavek 18), je treba izvesti predhodni presejalni preskus, da se določi ustrezna velikost odmerka za preskušanje z analizo LLNA: DA. Namen predhodnega presejalnega preskusa je zagotoviti smernice za izbiro največje velikosti odmerka za uporabo v glavni študiji analize LLNA: DA v primerih, ko ni na voljo informacij o koncentraciji, ki povzroči sistemske toksičnosti (glej odstavek 24) in/ali čezmerno draženje kože (glej odstavek 23). Največja velikost odmerka je 100-odstotna preskusna snov za tekočine ali najvišja možna koncentracija za trdne snovi ali suspenzije.

22. Predhodni presejalni preskus se izvede v pogojih, ki so enaki tistim v glavni študiji analize LLNA: DA, s to razliko, da se ne izvede ocena množenja v bezgavkah in da se lahko uporabi manj živali na skupino odmerka. Predlaga se uporaba ene ali dveh živali na skupino odmerka. Vse miši se opazuje dnevno glede kliničnih znakov sistemske toksičnosti ali lokalnega draženja na mestu nanosa. Telesna masa se zabeleži pred preskusom in pred usmrtnitvijo (8. dan). Obe ušesi vsake miši se opazuje glede rdečine in oceni s pomočjo preglednice 1 (25). Meritve debeline ušesa se izvedejo z napravo za merjenje debeline (npr. digitalnim mikrometrom ali merilnikom debeline s številčnico) 1. dan (pred odmerkom), 3. dan (približno 48 ur pred prvim odmerkom), 7. dan (24 ur pred usmrtnitvijo) in 8. dan. Poleg tega se lahko 8. dan debelino ušesa določi s preluknjanjem ušes za določitev mase, ki se izvede po humani usmrtnitvi živali. Znak za čezmerno draženje je rdečina z oceno ≥ 3 in/ali povečana debelina ušesa za $\geq 25\%$ na kateri koli dan merjenja (26) in (27). Največji odmerek, izbran za glavno študijo analize LLNA: DA, je naslednji nižji odmerek v seriji koncentracij iz predhodnega presejalnega preskusa (glej odstavek 18), ki ne povzroči sistemske toksičnosti in/ali čezmernega draženja kože.

Preglednica 1

Ocena rdečine

Ugotovitev	Ocena
Rdečine ni	0
Neznatna rdečina (komajda opazna)	1
Zelo razločna rdečina	2
Zmerna do močna rdečina	3
Močna rdečina (rdečina rdeče pese) in nastanek krast ovirata razvrstitev rdečine	4

23. Poleg 25-odstotnega povečanja debeline ušesa (26) (27), se za opredelitev dražilnih snovi pri LLNA uporablja tudi statistično značilno povečanje debeline ušesa tretirane miši v primerjavi s kontrolno mišjo tako uporablja za opredelitev dražilnih snovi pri lokalni analizi bezgavk (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Ker pa se lahko statistično značilno povečanje pojavi tudi pri debelini ušesa, manjši od 25 %, ni izrecno povezano s čezmernim draženjem (30) (31) (32) (33) (34).
24. Naslednje klinične ugotovitve lahko nakazujejo sistemsko toksičnost (35), kadar se uporabljajo kot del celovite ocene, in zato lahko pokažejo največjo velikost odmerka za uporabo v glavni analizi LLNA: DA: spremembe v delovanju živčnega sistema (npr. piloerekcija, ataksija, tremorji in krči); vedenjske spremembe (npr. agresivnost, spremembe glede nege, opazna sprememba ravni dejavnosti); spremembe dihanja (npr. spremembe frekvence in intenzivnosti dihanja kot so dispneja, zasoplost in hropenje) ter spremembe glede uživanja hrane in vode. Poleg tega je treba pri oceni upoštevati znake letargije in/ali neodzivnosti ter morebitne klinične znake bolečine in trpljenja, ki niso samo blagi ali trenutni, ali zmanjšanje telesne mase za $> 5\%$ od 1. do 8. dne ter smrtnost. Umirajoče živali ali živali, ki kažejo znake hudega in dolgotrajnega trpljenja, se usmrtijo na human način (36).

Načrt za poskus glavne študije

25. Načrt za poskus analize je naslednji:

- 1. dan: Posamično ugotovljena in zabeležena masa vsake živali in morebitne klinične ugotovitve. Nanos 1-odstotne vodne raztopine natrijevega laurel sulfata (SLS) na vsak uhelj, s pomočjo čopiča, namočenega v raztopino SLS, in premaz celotnega uhlja v štirih do petih potezah. Uro po obdelavi s SLS sledi nanos 25 μ l ustrezno razredčene preskusne snovi, samega nosilca ali pozitivne kontrole (primerjalne ali izvedene pred kratkim, odvisno od politike laboratorija pri upoštevanju odstavkov 11–15 na vsak uhelj).
- 2., 3. in 7. dan: Ponovi se postopek predhodne obdelave z 1-odstotno vodno raztopino SLS in nanosa preskusne snovi, ki je bil izveden 1. dan.
- 4., 5. in 6. dan: Brez tretiranja.
- 8. dan: Zabeleži se masa vsake živali in morebitne klinične ugotovitve. Približno 24 do 30 ur po začetku nanašanja 7. dne se živali humano usmrti. Ušesne bezgavke ob vsakem ušesu miši se izrežejo in shranijo v fosfatni pufer s soljo (PBS) za vsako žival. Podatki in diagrami o identifikaciji in izrezu bezgavk so na voljo v sklicu (22). Za nadaljnje spremljanje odziva kože v glavni študiji se lahko v študijski protokol vključijo dodatni parametri, kot so ocena rdečine ušesa ali meritve debeline ušesa (pridobljene z merilnikom debeline ali preluknjanjem ušes za določitev mase pri obdukciji).

Priprava celičnih suspenzij

26. Enotna celična suspenzija iz celic bilateralno izrezanih bezgavk vsake miši se pripravi tako, da se bezgavke namesti med dve objektni stekelci, ki se ju nežno stisne in tako zdrobi bezgavke. Po potrditvi, da se je tkivo na tanko razširilo, se stekelci povlečeta narazen. Tkivo na obeh stekelcih se suspendira s fosfatnim pufrom s soljo tako, da se vsako stekelce drži pod kotom nad petrijevko in spira s PBS ter istočasno strga tkivo s stekelca. Bezgavke živali v negativni kontroli so majhne, zato je treba biti pazljiv, da ne pride do umetnega vpliva na vrednosti SI. Za spiranje obeh stekelc se uporabi skupno 1 ml PBS. Suspenzija iz celic bezgavk v petrijevki se narahlo zmeša s strgalom za celice. Nato se s mikropipeto zbere 20 μ L alikvota suspenzije iz celic bezgavk, pri čemer je treba paziti, da se ne pobere membrana, vidna z očesom, in zmeša z 1,98 ml PBS, s čimer dobimo 2 ml vzorec. Z enakim postopkom se nato pripravi drugi 2 ml vzorec, tako da sta za vsako žival pripravljena dva vzorca.

Določitev množenja celic (merjenje vsebnosti adenozin-trifosfata (ATP) pri limfocitih)

27. Povečanje vsebnosti ATP v bezgavkah se meri z metodo luciferina/luciferaze z uporabo kompleta za merjenje ATP, ki meri bioluminiscenco v relativnih luminiscenčnih enotah (RLU). Čas analize od časa usmrtnitve živali do merjenja vsebnosti ATP za vsako posamezno žival mora biti enak, in sicer približno 30 minut, ker se vsebnost ATP po usmrtnitvi živali postopoma zmanjšuje (12). Zato mora biti serija postopkov od izreza ušesnih bezgavk do merjenja ATP izvedena v 20 minutah z vnaprej določenim časovnim razporedom, ki je enak za vsako žival. Luminiscenca ATP se izmeri v vsakem 2 ml vzorcu, tako da se za vsako žival pridobi dve meritvi ATP. Nato se določi povprečna luminiscenca ATP, ki se uporabi pri nadaljnjih izračunih (glej odstavek 30).

OPAZOVANJA**Klinična opazovanja**

28. Vsako miš je treba vsaj enkrat dnevno natančno opazovati glede kliničnih znakov, lokalnega draženja na mestu nanosa ali sistemske toksičnosti. Vsa opazovanja se sistematično zabeležijo v evidence, ki se vodijo za vsako miš. Načrt spremljanja vključuje merila za hitro identifikacijo miši, ki izražajo sistemsko toksičnost, čezmerno draženje kože ali jedkost za kožo zaradi evtanazije (36).

Telesna masa

29. Kot je navedeno v odstavku 25 se telesna masa posameznih živali izmeri na začetku preskusa in ob predvideni humani usmrtnitvi.

IZRAČUN REZULTATOV

30. Rezultati za vsako tretirano skupino so izraženi kot povprečni stimulacijski indeks (SI). SI se dobi tako, da se povprečno število relativne luminiscenčne enote/miš v vsaki skupini preskusne snovi in v pozitivni kontrolni skupini deli s povprečnim številom relativne luminiscenčne enote/miš za kontrolno skupino s topilom/nosilcem. Povprečni stimulacijski indeks za kontrolne skupine z nosilcem je potem 1.
31. Rezultat se šteje za pozitiven, če je SI $\geq 1,8$ (10). Vendar se lahko pri odločanju, ali je mejni rezultat pozitiven (tj. vrednost SI med 1,8 in 2,5), uporabijo tudi moč odziva na odmerek, statistični pomen ter doslednost odzivov v topilu/nosilcu in pozitivni kontroli (2) (3) (37).
32. Pri mejnem pozitivnem odzivu s SI med 1,8 in 2,5 bodo uporabniki morda za potrditev, da so takšni rezultati pozitivni, poleg vrednostih SI upoštevali tudi moč odziva na odmerek, dokaze o sistemski toksičnosti ali statistični pomen (10). Upoštevati je treba tudi različne lastnosti preskusne snovi, vključno s strukturno podobnostjo z znanimi povzročitelji preobčutljivosti, povzročanjem čezmernega lokalnega draženja kože pri miši ter naravo opaženega odnosa med odmerkom in odzivom. Ti in drugi razlogi so podrobno obdelani drugje (4).
33. Zbiranje podatkov na ravni posamezne miši bo omogočilo statistično analizo prisotnosti in stopnje odnosa med odmerkom in odzivom v podatkih. Morebitna statistična ocena lahko vključuje oceno odnosa med odmerkom in odzivom ter ustrezno prilagojene primerjave preskusnih skupin (npr. skupina, ki je prejela odmerek v parih, proti primerjavam primerjalnih kontrolnih skupin s topilom/nosilcem). Statistična analiza lahko obsega npr. linearno regresijo ali Williamsov preskus za oceno nihanj odziva na odmerek in Dunnettov preskus za primerjave po parih. Pri izbiri ustrezne metode statistične analize se mora raziskovalec zavedati možnih neenakosti varianc in drugih sorodnih problemov, zaradi katerih je lahko nujna pretvorba podatkov ali neparametrška statistična analiza. V vsakem primeru bo moral raziskovalec morda izvesti izračune stimulacijskega indeksa in statistične analize s podatkovnimi točkami (včasih imenovanimi 'izločitve') in brez njih.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

34. Podatki se povzamejo v obliki preglednice, ki prikazuje vrednosti relativne luminiscenčne enote za posamezno žival, skupinsko povprečje relativne luminiscenčne enote/žival, s tem povezane napake (npr. SD, SEM) in povprečni SI za vsako skupino odmerka v primerjavi s primerjalno kontrolno skupino s topilom/nosilcem.

Poročilo o preskusu

35. Poročilo o preskusu vsebuje naslednje informacije:

preskusne in kontrolne kemikalije:

- identifikacijske podatke (npr. številko CAS in številko EC, če je na voljo; vir; čistost; znane nečistoče, številko serije),
- fizikalno stanje in fizikalno-kemijske lastnosti (npr. hlapnost, stabilnost, topnost),
- če je zmes, sestavo in relativne odstotke sestavin;

topilo/nosilec:

- identifikacijske podatke (čistost, po potrebi koncentracijo, uporabljeno količino),
- utemeljitev izbire uporabljenega nosilca;

preskusne živali:

- vir miši seva CBA,
- mikrobiološki status živali, če je znan,
- število in starost živali,
- vir živali, namestitvene pogoje, prehrano, itd.;

preskusni pogoji:

- vir, številko serije in podatke proizvajalca glede zagotavljanja kakovosti/nadzora kakovosti kompleta za ATP,
- podatke o pripravi in uporabi preskusne snovi,
- utemeljitev izbire odmerka (vključno z rezultati predhodnega presejalnega preskusa, če je bil izveden),
- uporabljene koncentracije nosilca in preskusne snovi in skupno količino uporabljene preskusne snovi,
- podatke o kakovosti hrane in vode (vključno z vrsto/virom prehranjevanja, virom vode),
- podatke o programih tretiranja in vzorčenja,
- metode merjenja toksičnosti,
- merila za obravnavanje študij kot pozitivnih ali negativnih,
- podrobnosti o morebitnih odstopanjih protokola in pojasnilo, kako odstopanje vpliva na zasnovano študije in njene rezultate;

preverjanje zanesljivosti:

- povzetek rezultatov zadnjega preverjanja zanesljivosti, vključno z informacijami o uporabljeni preskusni snovi, koncentraciji in nosilcu,

- primerjalne in/ali pretekle pozitivne in primerjalne negativne (topilo/nosilec) kontrolne podatke za preskuševalni laboratorij,
- če primerjalna pozitivna kontrola ni bila vključena, datum in laboratorijsko poročilo nazadnje izvedene redne pozitivne kontrole in poročilo, ki navaja pretekle pozitivne kontrolne podatke za laboratorij, na podlagi katerih je upravičeno neizvajanje primerjalne pozitivne kontrole;

rezultati:

- posamezne mase živali na začetku odmerjanja in ob predvideni usmrtnitvi; ter povprečno in povezano napako (npr. SD, SEM) za vsako tretirano skupino,
- časovni potek začetka toksičnosti in njenih znakov, vključno z morebitnim draženjem kože na mestu dajanja za vsako žival,
- čas usmrtnitve živali in čas merjenja ATP za vsako žival,
- preglednico z vrednostmi relativne luminiscenčne enote in vrednostmi stimulacijskega indeksa za vsako tretirano skupino odmerka,
- povprečno in povezano napako (npr. SD, SPM) za relativno luminiscenčno enoto/miš za vsako tretirano skupino,
- izračunan SI in ustrezno merilo spremenljivosti, ki upošteva spremenljivost med posameznimi živalmi tako v preskusni snovi kot kontrolnih skupinah,
- odnos med odmerkom in odzivom,
- po potrebi, statistične analize;

razprava o rezultatih:

- kratke pripombe o rezultatih, analizo odziva na odmerek in po potrebi statistične analize, s sklepom, ali naj se preskusna snov šteje za povzročitelja preobčutljivosti kože.

VIRI

1. OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: <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. Na voljo na spletni strani: 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. Na voljo na spletni strani: <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. Na voljo na spletni strani: 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. Na voljo na spletni strani: <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. Na voljo na spletni strani: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStd.pdf.
23. McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 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. Na voljo na spletni strani: <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. Na voljo na spletni strani: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/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. Na voljo na spletni strani: 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. Na voljo na spletni strani: <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*, 53563–79.
38. OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Na voljo na spletni strani: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Natančnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode z uveljavljenimi referenčnimi vrednostmi. To je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz „skladnost“ se pogosto izmenično uporabljata za pomen deleža ustreznih rezultatov preskusne metode (38).

Primerjalna snov: snov, ki povzroča preobčutljivost ali je ne povzroča in se uporablja kot standard za primerjavo s preskusno snovjo. Primerjalna snov mora imeti naslednje lastnosti: (i) trajen in zanesljiv vir; (ii) strukturno in funkcijsko podobnost z razredom preskušanih snovi; (iii) znane fizikalno-kemijske lastnosti; (iv) podporne podatke o znanih učinkih in (v) znano učinkovitost v razponu zelene reakcije.

Lažno negativna snov: snov, ki je s preskusno metodo nepravilno opredeljena kot negativna ali neaktivna, čeprav je dejansko pozitivna ali aktivna.

Lažno pozitivna snov: snov, ki je s preskusom nepravilno opredeljena kot pozitivna ali aktivna, čeprav je dejansko negativna ali neaktivna.

Nevarnost: možnost škodljivega učinka na zdravje ali okolje. Do škodljivega učinka pride, če je raven izpostavljenosti dovolj velika.

Ponovljivost v laboratorijih: merjenje obsega, v katerem lahko različni kvalificirani laboratoriji, ki uporabljajo isti protokol in preskušajo iste preskusne snovi, pridejo do kvalitativno in kvantitativno podobnih rezultatov. Ponovljivost v laboratorijih se ugotovi med postopki pred validacijo in med validacijo ter kaže, v kakšnem obsegu se lahko preskus uspešno uporablja v več laboratorijih; imenuje se tudi ponovljivost v različnih laboratorijih (38).

Ponovljivost v laboratoriju: določitev obsega, v katerem lahko kvalificirane osebe v istem laboratoriju uspešno ponovijo rezultate z uporabo določenega protokola v različnem času. Imenuje se tudi ponovljivost znotraj laboratorija (38).

Izločitev: izločitev je ugotovitev, ki se izrazito razlikuje od drugih vrednosti v naključnem vzorcu populacije.

Zagotavljanje kakovosti: postopek upravljanja, pri katerem posamezniki, neodvisni od oseb, ki so izvajale preskuse, ocenijo izpolnjevanje laboratorijskih standardov za preskušanje, zahtev in postopkov vodenja evidenc ter natančnosti prenosa podatkov.

Zanesljivost: stopnja ponovljivosti preskusne metode v laboratorijih in med njimi v določenem časovnem obdobju pri uporabi istega protokola. Ocenijo se z izračunom ponovljivosti v enem ali več laboratorijih (38).

Preobčutljivost kože: imunološki proces, ki se pojavi, ko je občutljiv posameznik lokalno izpostavljen kemičnemu alergen, ki na koži sproži imunski odziv in lahko povzroči razvoj preobčutljivosti ob stiku.

Stimulacijski indeks (SI): vrednost, izračunana za oceno morebitne preobčutljivosti kože, ki jo lahko povzroči preskusna snov; je razmerje med množenjem v tretiranih skupinah in množenjem v primerjalni kontrolni skupini z nosilcem.

Preskusna snov (imenovana tudi preskusna kemikalija): katera koli snov ali zmes, preskušana z uporabo te preskusne metode.

B.51. PREOBČUTLJIVOST KOŽE: LOKALNA ANALIZA BEZGAVK: BRDU-ELISA

UVOD

1. Smernice OECD za preskušanje kemikalij in preskusne metode EU se redno preverjajo zaradi znanstvenega napredka, spreminjajočih se zakonodajnih potreb in vprašanj, povezanih z dobrim počutjem živali. Prva preskusna metoda (B.42) za določanje preobčutljivosti kože pri miši, lokalna analiza bezgavk (LLNA; Smernica za preskušanje OECD 429) je bila že preverjena (1 in poglavje B.42 te Priloge). Objavljene so podrobnosti o validaciji LLNA in pregled s tem povezanega dela (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Pri LLNA se za merjenje množenja limfocitov uporablja radioizotopni timidin ali jod, zato je lahko uporaba analize omejena v primerih, kjer je pridobitev, uporaba ali odstranitev radioaktivnosti težavna. LLNA: BrdU-ELISA [encimsko-immunski test, v nadaljnjem besedilu: analiza LLNA: BrdU-ELISA] je neradioaktivna različica LLNA, pri kateri se uporablja radioaktivno neoznačen 5-bromo 2-deoksiuridin (BrdU) (Služba za izmenjavo kemijskih izvlečkov [CAS] št. 59-14-3) v preskusnem sistemu, ki temelji na encimsko-immunskem testu za merjenje množenja limfocitov. Analizo LLNA: BrdU-ELISA je validirala in pregledala mednarodna neodvisna strokovna skupina za ocenjevanje ter jo priporočila kot koristno za opredelitev kemikalij, ki povzročajo preobčutljivost, in kemikalij, ki je ne povzročajo, z nekaterimi omejitvami (10) (11) (12). Ta preskusna metoda je zasnovana za ocenjevanje morebitne preobčutljivosti kože s kemikalijami (snovni in zmesni) pri živalih. Poglavje B.6 te priloge in Smernica za preskušanje OECD 406 uporabljata preskuse na morskih prašičkih, predvsem maksimizacijski in Buehlerjev preskus na morskih prašičkih (13). LLNA (poglavje B.42 te priloge; Smernica za preskušanje OECD 429) in dve spremembi, pri katerih se radioaktivnost ne uporablja, analiza LLNA: BrdU-ELISA (poglavje B.51 te priloge; Smernica za preskušanje OECD 442 B) in analiza LLNA: DA (poglavje B.50 te priloge; Smernica za preskušanje OECD 442 A) zaradi manj pogoste in izpopolnjene uporabe živali zagotavljajo prednost v primerjavi s preskusi na morskih prašičkih iz metode B.6 in Smernice za preskušanje OECD 406 (13).

2. Podobno kot LLNA tudi analiza LLNA: BrdU-ELISA preučuje indukcijsko fazo preobčutljivosti kože in zagotavlja količinske podatke, ki so primerni za oceno odziva na odmerek. Ker odkriva povzročitelje preobčutljivosti, ne da bi bilo pri tem treba uporabiti radioaktivni označevalec za DNA, se ne pojavljajo vprašanja glede poklicne izpostavljenosti radioaktivnosti in odstranjevanja odpadkov. Zaradi tega bo za odkrivanje povzročiteljev preobčutljivosti morda mogoča pogostejša uporaba miši, zaradi česar bi se lahko še bolj zmanjšala uporaba morskih prašičkov za preskušanje morebitne preobčutljivosti kože (tj. B.6; Smernica za preskušanje OECD 406) (13).

OPREDELITVE POJMOV

3. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI POMISLEKI IN OMEJITVE

4. Analiza LLNA: BrdU-ELISA je spremenjena metoda LLNA za ugotavljanje morebitne preobčutljivosti kože s kemikalijami, s posebnimi omejitvami. Ni nujno, da to pomeni, da je treba v vseh primerih namesto preskusov na morskih prašičkih ali LLNA (tj. B.6; Smernica za preskušanje OECD 406) (13) uporabiti analizo LLNA: BrdU-ELISA, temveč da je ta analiza enakovredna in se lahko uporabi kot druga možnost, pri kateri običajno niso več potrebne dodatne potrditve pozitivnih in negativnih rezultatov (10) (11). Preskuševalni laboratorij mora pred začetkom opravljanja študije upoštevati vse razpoložljive informacije o preskusni snovi. Takšne informacije bodo vključevale vrsto in kemijsko sestavo preskusne snovi; njene fizikalno-kemijske lastnosti; rezultate katerih koli drugih preskusov toksičnosti na preskusni snovi, *in vitro* ali *in vivo*; in toksikološke podatke o strukturno sorodnih kemikalijah. Te informacije je treba upoštevati, da se določi, ali je metoda LLNA: BrdU-ELISA primerna za preskusno snov (glede na nezdružljivost omejenega števila vrst kemikalij z analizo LLNA: BrdU-ELISA [glej odstavek 5]) in za lažjo izbiro odmerka.
5. Analiza LLNA: BrdU-ELISA je metoda *in vivo* in posledično ne odpravlja uporabe živali pri ocenjevanju delovanj, ki povzročajo alergijsko preobčutljivost ob stiku. Vendar ima možnost, da v primerjavi s preskusi na morskih prašičkih (B.6; Smernica za preskušanje OECD 406) (13), zmanjša število živali, potrebnih v ta namen. Poleg tega nudi analiza LLNA: BrdU-ELISA znatno izboljšanje načina, kako se živali uporabljajo za preskušanje alergijske preobčutljivosti ob stiku, saj v nasprotju z metodo B.6 in Smernico za preskušanje OECD 406 ne zahteva, da se povzročijo izzvane reakcije prekomerne občutljivosti kože. Poleg tega analiza LLNA: BrdU-ELISA za razliko od maksimizacijskega preskusa na morskih prašičkih ne zahteva uporabe pomožnega preskusa (poglavje B.6 te priloge, 13). S tem analiza LLNA: BrdU-ELISA zmanjšuje trpljenje živali. Kljub prednostim analize LLNA: BrdU-ELISA v primerjavi z metodo B.6 in Smernico za preskušanje OECD 406 (13) obstajajo nekatere omejitve, zaradi katerih je lahko nujna uporaba metode B.6 ali Smernice za preskušanje OECD 406 (npr. preskušanje določenih kovin, lažni pozitivni izidi pri nekaterih dražilnih snoveh za kožo [kot so nekatere vrste površinsko razgradljivih kemikalij] (6) (1 in poglavje B.42 te priloge), topnost preskusne snovi). Poleg tega je zaradi kemijskih razredov ali snovi s funkcionalnimi skupinami, za katere se je izkazalo, da lahko delujejo kot moteči dejavniki (15), lahko potrebna uporaba preskusov na morskih prašičkih (tj. B.6; Smernica za preskušanje OECD 406 (13)). Za omejitve, določene za LLNA (1 in poglavje B.42 te priloge), je bilo priporočeno, da se uporabljajo tudi za analizo LLNA: BrdU-ELISA (10). Razen takšnih določenih omejitev bi morala biti analiza LLNA: BrdU-ELISA primerna za preskušanje katerih koli kemikalij, razen če so s temi kemikalijami povezane lastnosti, ki lahko ovirajo natančnost analize LLNA: BrdU-ELISA. Poleg tega je treba razmisliti o možnosti mejnih pozitivnih rezultatov v primerih, ko so dobljene vrednosti stimulacijskega indeksa (SI) med 1,6 in 1,9 (glej odstavke 31–32). To temelji na podatkovni zbirki za validacijo s 43 snovmi s stimulacijskim indeksom $\geq 1,6$ (glej odstavek 6), pri kateri je analiza LLNA: BrdU-ELISA pravilno opredelila vseh 32 povzročiteljev preobčutljivosti pri LLNA, vendar je nepravilno opredelila dve od 11 snovi, ki pri LLNA ne povzročajo preobčutljivosti z vrednostmi stimulacijskega indeksa med 1,6 in 1,9 (tj. mejno pozitivna vrednost) (10). Ker pa je bil za določanje vrednosti stimulacijskega indeksa in izračun predvidljivih lastnosti preskusa uporabljen isti nabor podatkov, so lahko navedeni rezultati pretirana ocena dejanskih predvidljivih lastnosti.

NAČELA METODE PRESKUŠANJA

6. Osnovno načelo, na katerem temelji analiza LLNA: BrdU-ELISA, je, da povzročitelji preobčutljivosti povzročijo množenje limfocitov v bezgavkah, ki drenirajo območje nanosa preskusne snovi. To množenje je sorazmerno z odmerkom in močjo uporabljenega alergena in je preprosto sredstvo za doseganje količinske izmere preobčutljivosti. Množenje se izmeri s primerjavo povprečnega množenja v vsaki preskusni skupini in povprečnega množenja v kontrolni skupini, tretirani z nosilcem. Določi se razmerje med povprečnim množenjem v vsaki tretirani skupini in povprečnim množenjem v primerjalni kontrolni skupini z nosilcem, ki se imenuje stimulacijski indeks (SI) in mora biti $\geq 1,6$, preden je nadaljnje ocenjevanje preskusne snovi kot možnega povzročitelja preobčutljivosti kože utemeljeno. Opisani postopki temeljijo na merjenju vsebnosti BrdU, ki kaže povečano število množečih se celic v ušesnih bezgavkah. BrdU je analog timidina in se v množeče se celice DNA vključi na podoben način. Vključitev BrdU se meri z encimsko-imunskim testom, ki uporablja protitelo, specifično za BrdU, ki je označeno tudi s peroksidazo. Ko se doda substrat, peroksidaza reagira s substratom in nastane obarvan produkt, ki je količinsko opredeljen pri določenih absorbciji z uporabo čitalca mikrotitrerskih plošč.

OPIS ANALIZE**Izbira živalskih vrst**

7. Izbrana vrsta za ta preskus je miš. Validacijske študije za analizo LLNA: BrdU-ELISA so bile izvedene samo s sevom CBA/JN, ki je zato priporočeni sev (10) (12). Uporabijo se mlade odrasle mišje samice, ki še niso kotile in niso breje. Na začetku študije morajo biti živali stare 8–12 tednov, odstopanje mase živali pa mora biti čim manjše in ne sme presegati 20 % povprečne mase. Namesto tega se lahko uporabi druge seve in samce, ko je dobljenih dovolj podatkov za prikaz, da ne obstajajo značilne razlike v odzivu pri analizi LLNA: BrdU-ELISA.

Bivalni in prehranjevalni pogoji

8. Miši morajo biti skupinsko nastanjene (16), razen če je zagotovljena ustrezna znanstvena utemeljitev za njihovo ločeno nastanitev. Temperatura v prostoru za poskusne živali mora biti 22 ± 3 °C. Čeprav mora biti relativna vlažnost najmanj 30 % in po možnosti ne sme presegati 70 %, mora biti ciljna vlažnost, razen med čiščenjem prostora, 50 do 60 %. Osvetlitev naj bo umetna, in sicer 12 ur svetlobe, 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja konvencionalna laboratorijska prehrana z neomejeno oskrbo s pitno vodo.

Priprava živali

9. Živali se naključno izberejo, označijo tako, da je omogočeno posamično prepoznavanje (vendar ne s katero od oblik ušesnih oznak), in zadržijo v kletkah najmanj pet dni pred začetkom dajanja odmerka, da se lahko prilagodijo laboratorijskim razmeram. Pred začetkom tretiranja se vse živali pregledajo, da se zagotovi, da nimajo opaznih kožnih lezij.

Priprava preskusnih raztopin

10. Trdne kemikalije se pred nanosom na uho miši raztopijo ali suspendirajo v ustreznih topilih ali nosilcih in po potrebi razredčijo. Tekoče kemikalije se lahko nanesejo nerazredčene ali pa se razredčijo pred dajanjem odmerka. Pri netopnih kemikalijah, kot so tiste, ki se običajno uporabljajo v medicinskih pripomočkih, je treba uporabiti močno povečano ekstrakcijo v ustreznem topilu, da se odkrije vse ekstraktibilne sestavine za preskušanje pred nanosom na uho miši. Preskusne snovi je treba pripravljati dnevno, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

Preverjanje zanesljivosti

11. Za prikaz ustrezne učinkovitosti analize se uporabijo kemikalije pozitivne kontrole, ki se odzovejo z ustrezno in ponovljivo občutljivostjo kot preskusna snov, ki povzroča preobčutljivost, za katero je stopnja reakcije natančno opredeljena. Uporaba primerjalne pozitivne kontrole je priporočena, saj pokaže zmožnost laboratorija, da uspešno izvede vsako analizo, ter omogoča ocenjevanje ponovljivosti in primerljivosti v enem ali več laboratorijih. Tudi nekateri regulativni organi zahtevajo uporabo pozitivne kontrole pri vsaki raziskavi, zato se uporabnikom priporoča, da se pred izvedbo analize LLNA: BrdU-ELISA posvetujejo s pristojnimi organi. V skladu s tem se priporoča redna uporaba primerjalne pozitivne kontrole, saj tako ni potrebno dodatno preskušanje na živalih za izpolnitev zahtev, ki se lahko pojavijo zaradi uporabe redne pozitivne kontrole (glej odstavek 12). Pozitivna kontrola mora povzročiti pozitiven odziv analize LLNA: BrdU-ELISA na raven izpostavljenosti, za katero se pričakuje, da bo dala večji stimulacijski indeks $SI \geq 1,6$ kot negativna kontrolna skupina. Odmerek pozitivne kontrole je treba izbrati tako, da ne povzroči čezmernega draženja kože ali sistemske toksičnosti in da je indukcija ponovljiva, vendar ne čezmerna (tj. $SI > 14$ bi se štel za čezmernega). Priporočena pozitivna kontrola je 25-odstotni heksil cimetov aldehyd (CAS št. 101-86-0) in 25-odstotni evgenol (št. CAS 97-53-0) v acetonu: olivnem olju (4:1, v/v). V nekaterih okoliščinah se lahko ob ustreznih utemeljitvi uporabijo druge pozitivne kontrole, ki izpolnjujejo zgornja merila.
12. Običajno je uporaba pozitivne kontrolne skupine priporočena, lahko pa obstajajo okoliščine, v katerih redno preskušanje (tj. v razmikih ≤ 6 mesecev) pozitivne kontrole morda zadošča za laboratorije, ki redno izvajajo analizo LLNA: BrdU-ELISA (tj. izvajajo analizo LLNA: BrdU-ELISA vsaj enkrat mesečno) in imajo vzpostavljeno zbirko preteklih podatkov o pozitivnih kontrolah, ki dokazuje zmožnost laboratorija, da pridobi ponovljive in natančne rezultate s pozitivnimi kontrolami. Ustrezna strokovnost pri izvajanju analize LLNA: BrdU-ELISA se lahko uspešno dokaže z dobivanjem doslednih pozitivnih rezultatov s pozitivno kontrolo pri vsaj desetih neodvisnih preskusih, izvedenih v razumnem časovnem obdobju (tj. v manj kot enem letu).
13. Primerjalno pozitivno kontrolno skupino je treba vključiti vedno, kadar pride do postopkovne spremembe pri analizi LLNA: BrdU-ELISA (npr. zamenjava usposobljenega osebja, zamenjava materiala za preskusno metodo in/ali reagentov, zamenjava opreme za preskusno metodo, zamenjava vira preskusnih živali), takšne spremembe pa je treba vedno zabeležiti v laboratorijskih poročilih. Pri odločanju o nujnosti vzpostavitve nove zbirke preteklih podatkov za beleženje doslednosti pri rezultatih pozitivne kontrole je treba upoštevati učinek, ki ga imajo te spremembe na ustreznost predhodno vzpostavljene zbirke preteklih podatkov.

14. Raziskovalci se morajo zavedati, da odločitev o izvajanju redne namesto primerjalne pozitivne kontrolne študije vpliva na ustreznost in sprejemljivost negativnih rezultatov študije, pridobljenih brez primerjalne pozitivne kontrole v razmiku med rednimi pozitivnimi kontrolnimi študijami. Na primer, če je rezultat, pridobljen z redno pozitivno kontrolno študijo, lažno negativen, so lahko vprašljivi negativni rezultati preskusne snovi, pridobljeni v času med zadnjo sprejemljivo redno pozitivno kontrolno študijo in nesprejemljivo redno pozitivno kontrolno študijo. Pri odločanju, ali vključiti primerjalne pozitivne kontrole ali izvajati samo redne pozitivne kontrole, je treba skrbno preučiti posledice teh rezultatov. Treba je razmisliti tudi o uporabi manjšega števila živali v primerjalni pozitivni kontrolni skupini, če je to znanstveno utemeljeno in če laboratorij na podlagi preteklih podatkov, značilnih za laboratorij, dokaže, da se lahko uporabi manjše število miši (17).
15. Čeprav je treba pozitivno kontrolo preskusiti v nosilcu, za katerega je znano, da povzroča dosleden odziv (npr. aceton: olivno olje; 4:1, v/v), lahko obstajajo nekatere zakonodajne okoliščine, ko je potrebno tudi preskušanje v nestandardnem nosilcu (klinično/kemično ustrezne sestave) (18). Če se primerjalna pozitivna kontrola preskuša v drugem nosilcu kot preskusna snov, je treba za primerjalno pozitivno kontrolo vključiti ločen kontrolni nosilec.
16. V primerih, kjer se ocenjujejo preskusne snovi za poseben kemijski razred ali razpon reakcij, so lahko primerjalne snovi uporabne tudi za dokaz, da preskusna metoda deluje pravilno za odkrivanje morebitne preobčutljivosti kože pri teh vrstah preskusnih snovi. Ustrezne primerjalne snovi morajo imeti naslednje lastnosti:
- strukturno in funkcijsko podobnost z razredom preskusne snovi, ki se preskuša,
 - znane fizikalno-kemijske lastnosti,
 - podporne podatke iz analiz LLNA: BrdU-ELISA,
 - podporne podatke od drugih živalskih modelov in/ali ljudi.

PRESKUSNI POSTOPEK

Število živali in velikost odmerkov

17. Na skupino odmerka se uporabijo najmanj štiri živali z najmanj tremi koncentracijami preskusne snovi, poleg tega pa še primerjalna negativna kontrolna skupina, tretirana zgolj z nosilcem za preskusno snov, in pozitivna kontrolna skupina (primerjalna ali izvedena pred kratkim, odvisno od politike laboratorija pri upoštevanju odstavkov 11–15). Treba je razmisliti o preskušanju več odmerkov pozitivne kontrole, zlasti če se pozitivna kontrola preskuša občasno. Živali v kontrolnih skupinah je treba, razen če se ne tretirajo s preskusno snovjo, obravnavati in tretirati na enak način kot živali v tretiranih skupinah.
18. Izbira odmerka in nosilca mora temeljiti na priporočilih iz sklicev (2) in (19). Zaporedni odmerki se običajno izberejo iz ustrezne serije koncentracij, kot so 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % itd. Izbira uporabljene serije koncentracij mora biti ustrezno znanstveno utemeljena. Kadar so na voljo, je treba pri izbiri treh zaporednih koncentracij upoštevati vse obstoječe toksikološke informacije (npr. akutno toksičnost in draženje kože) ter strukturne in fizikalno-kemijske informacije o želeni preskusni snovi (in/ali strukturno povezani snovi), tako da je pri največji koncentraciji izpostavljenost največja, hkrati pa ni systemske toksičnosti in/ali čezmernega draženja kože (19) (20 in poglavje B.4 te Priloge). Če takšne informacije niso na voljo, je morda najprej potreben predhodni presejalni preskus (glej odstavke 21–24).
19. Nosilec ne sme ovirati rezultatov preskusa ali vplivati nanje, izbere pa se na podlagi povečevanja topnosti, da se med pripravljanjem raztopine/suspenzije, ki je primerna za uporabo preskusne snovi, pridobi največjo možno koncentracijo. Priporočljivi nosilci so aceton: olivno olje (4:1, v/v), N,N-dimetilformamid, metil etil keton, propilen glikol in dimetil sulfoksid (6), vendar se lahko uporabljajo tudi drugi, če je zagotovljena ustrezna znanstvena utemeljitev. V nekaterih okoliščinah je morda treba kot dodatno kontrolo uporabiti klinično ustrezno topilo ali trgovsko sestavo, v kateri se trži preskusna snov. Paziti je treba zlasti, da so v nosilni sistem vključene hidrofilne preskusne snovi, ki vlažijo kožo in se ne izsušijo takoj, z vključitvijo ustreznih pospeševalcev raztapljanja (npr. 1-odstotnim Pluronic® L92). Zato se je treba izogibati povsem vodenim nosilcem.
20. Obdelava bezgavk posamezne miši omogoča oceno spremenljivosti med posameznimi živalmi in statistično primerjavo razlik med meritvami preskusne snovi in primerjalne kontrolne skupine z nosilcem (glej odstavke 33). Poleg tega je ocena možnosti glede zmanjšanja števila miši v pozitivni kontrolni skupini izvedljiva samo, če se zbira podatke o posameznih živalih (17). Poleg tega nekateri regulativni organi zahtevajo zbiranje podatkov o posameznih živalih. Redno zbiranje podatkov o posameznih živalih zagotavlja prednosti glede dobrega počutja živali, saj se s tem prepreči dvojno preskušanje, ki bi bilo potrebno, če bi bilo treba rezultate, prvotno zbrane na en način (npr. preko združenih podatkov o živalih) zaradi drugih zahtev regulativnih organov (npr. glede podatkov o posameznih živalih) kasneje ponovno preučiti.

Predhodni presejalni preskus

21. Če informacije za določitev največjega odmerka za preskušanje niso na voljo (glej odstavek 18), je treba izvesti predhodni presejalni preskus, da se določi ustrezna velikost odmerka za preskušanje z analizo LLNA: BrdU-ELISA. Namen predhodnega presejalnega preskusa je zagotoviti smernice za izbiro največje velikosti odmerka za uporabo v glavni študiji analize LLNA: BrdU-ELISA v primerih, ko ni na voljo informacij o koncentraciji, ki povzroči sistemsko toksičnost (glej odstavek 24) in/ali čezmerno draženje kože (glej odstavek 23). Največja velikost odmerka je 100-odstotna koncentracija preskusne snovi za tekočine ali najvišja možna koncentracija za trdne snovi ali suspenzije.
22. Predhodni presejalni preskus se izvede v pogojih, ki so enaki tistim v glavni študiji analize LLNA: BrdU-ELISA, s to razliko, da se ne izvede ocena množenja v bezgavkah in da se lahko uporabi manj živali na skupino odmerka. Predlaga se uporaba ene ali dveh živali na skupino odmerka. Vse miši se opazuje dnevno glede kliničnih znakov sistemske toksičnosti ali lokalnega draženja na mestu nanosa. Telesna masa se zabeleži pred preskusom in pred usmrtnitvijo (6. dan). Obe ušesi vsake miši se opazuje glede rdečine in oceni s pomočjo preglednice 1 (20 in poglavje B.4 te priloge). Meritve debeline ušesa se izvedejo z napravo za merjenje debeline (npr. digitalnim mikrometrom ali merilnikom debeline s številčnico) 1. dan (pred odmerkom), 3. dan (približno 48 ur pred prvim odmerkom) in 6. dan. Poleg tega se lahko 6. dan debelino ušesa določi s preluknjanjem ušes za določitev mase, ki se izvede po humani usmrtnitvi živali. Znak za čezmerno draženje je rdečina z oceno ≥ 3 in/ali povečana debelina ušesa za $\geq 25\%$ na kateri koli dan merjenja (21) (22). Največji odmerek, izbran za glavno študijo analize LLNA: BrdU-ELISA, je naslednji nižji odmerek v seriji koncentracij iz predhodnega presejalnega preskusa (glej odstavek 18), ki ne povzroči sistemske toksičnosti in/ali čezmernega draženja kože.

*Preglednica 1***Ocena rdečine**

Ugotovitev	Ocena
Rdečine ni	0
Neznatna rdečina (komajda opazna)	1
Zelo razločna rdečina	2
Zmerna do močna rdečina	3
Močna rdečina (rdečina rdeče pese) in nastanek krast ovirata razvrstitev rdečine	4

23. Poleg 25-odstotnega povečanja debeline ušesa (21) (22) se za opredelitev dražilnih snovi pri LLNA uporablja tudi statistično značilno povečanje debeline ušesa tretirane miši v primerjavi s kontrolno mišjo (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Ker pa se lahko statistično značilno povečanje pojavi tudi pri debelini ušesa, manjši od 25 %, ni izrecno povezano s čezmernim draženjem (25) (26) (27) (28) (29).
24. Naslednje klinične ugotovitve lahko nakazujejo sistemsko toksičnost (30), kadar se uporabljajo kot del celovite ocene, in zato lahko pokažejo največjo velikost odmerka za uporabo v glavni analizi LLNA: BrdU-ELISA: spremembe v delovanju živčnega sistema (npr. piloerekcija, ataksija, tremorji in krči); vedenjske spremembe (npr. agresivnost, spremembe glede nege, opazna sprememba stopnje aktivnosti); spremembe dihanja (npr. spremembe frekvence in intenzivnosti dihanja, kot so dispneja, zasoplost in hropenje) in spremembe glede uživanja hrane in vode. Poleg tega je treba pri oceni upoštevati znake letargije in/ali neodzivnosti ter morebitne klinične znake bolečine in trpljenja, ki niso samo blagi ali trenutni, ali zmanjšanje telesne mase za $> 5\%$ od 1. do 6. dne ter smrtnost. Umirajoče živali ali živali, ki kažejo znake hudega in dolgotrajnega trpljenja, se usmrtnijo na human način (31).

Načrt za poskus glavne študije

25. Načrt za poskus analize je naslednji:

- 1. dan: Posamično ugotovljena in zabeležena masa vsake živali in morebitne klinične ugotovitve. Nanos 25 μ l ustrezno razredčene preskusne snovi, samega nosilca ali pozitivne kontrole (primerjalne ali izvedena pred kratkim, odvisno od politike laboratorija pri upoštevanju odstavkov 11–15) na vsak uhelj.
- 2. in 3. dan: Ponovi se postopek nanosa, ki je bil izveden 1. dan.
- 4. dan: Brez tretiranja.
- 5. dan: Intraperitonealno vbrizganje 0,5 ml (5 mg/miš) raztopine BrdU (10 mg/ml).

- 6. dan: Zabeleži se masa vsake živali in morebitne klinične ugotovitve. Približno 24 ur po vbrizgani BrdU se živali humano usmrti. Ušesne bezgavke ob vsakem ušesu miši se izrežejo in shranijo v fosfatni pufer s soljo (PBS) za vsako žival. Podatki in diagrami o identifikaciji in izrezu bezgavk so na voljo v sklicu (17). Za nadaljnje spremljanje odziva kože v glavni študiji se lahko v študijski protokol vključijo dodatni parametri, kot so ocena rdečine ušesa ali meritve debeline ušesa (pridobljene z merilnikom debeline ali preluknjanjem ušes za določitev mase pri obdukciji).

Priprava celičnih suspenzij

26. Enotna celična suspenzija iz celic bilateralno izrezanih bezgavk vsake miši se pripravi z blago mehanično disagregacijo skozi žično mrežo iz nerjavnega jekla z velikostjo odprtín 200 mikronov ali drugo uveljavljeno tehniko za pripravo enotne celične suspenzije (npr. uporabo plastičnega pestila za enkratno uporabo za drobljenje bezgavk, ki mu sledi prehajanje skozi mrežo iz najlona z velikostjo odprtín 70 mikronov). Postopek priprave suspenzije iz celic bezgavk je pri tej analizi bistvenega pomena, zato mora vsak izvajalec predhodno pridobiti te spretnosti. Bezgavke živali v negativni kontroli so majhne, zato je treba biti pazljiv, da ne pride do umetnega vpliva na vrednosti SI. V vsakem primeru je treba ciljni volumen suspenzije iz celic bezgavk prilagoditi določenemu optimiziranemu volumnu (približno 15 ml). Optimiziran volumen temelji na doseganju povprečne absorbanca negativne kontrolne skupine v razponu 0,1–0,2.

Določitev množenja celic (merjenje vsebnosti bromdeoksiuridina (BrdU) v DNA limfocitov)

27. BrdU se meri z encimsko-imunskim testom z uporabo tržnega kompleta (npr. Roche Applied Science, Mannheim, Nemčija, št. v katalogu 11 647 229 001). Na kratko, v vdolbinice treh mikroplošč z ravnim dnom se doda 100 µL suspenzije iz celic bezgavk. Po fiksaciji in denaturaciji celic iz bezgavk se v vsako vdolbinico doda anti-BrdU protitelo in omogoči, da pride do reakcije. Nato se anti-BrdU protitelo odstrani s spiranjem, doda se raztopina substrata in omogoči se, da nastane kromogen. Nato se izmeri absorbanca pri 370 nm z referenčno valovno dolžino 492 nm. V vseh primerih morajo biti preskusni pogoji analize optimizirani (glej odstavek 26).

OPAZOVANJA

Klinična opazovanja

28. Vsako miš je treba vsaj enkrat dnevno natančno opazovati glede kliničnih znakov, lokalnega draženja na mestu nanosa ali sistemske toksičnosti. Vsa opazovanja se sistematično zabeležijo v evidence, ki se vodijo za vsako miš. Načrt spremljanja vključuje merila za hitro identifikacijo miši, ki izražajo sistemsko toksičnost, čezmerno draženje kože ali jedkost za kožo zaradi evtanazije (31).

Telesna masa

29. Kot je navedeno v odstavku 25, se telesna masa posameznih živali izmeri na začetku preskusa in ob predvideni humani usmrtitvi.

IZRAČUN REZULTATOV

30. Rezultati za vsako tretirano skupino so izraženi kot povprečni stimulacijski indeks (SI). SI se dobi tako, da se povprečni indeks označevanja za BrdU/miš v vsaki skupini preskusne snovi in v pozitivni kontrolni skupini deli s povprečnim indeksom označevanja za BrdU za kontrolno skupino s topilom/nosilcem. Povprečni stimulacijski indeks za kontrolne skupine z nosilcem je potem 1.

Indeks označevanja za BrdU je opredeljen kot:

$$\text{indeks označevanja za BrdU} = (\text{ABS}_{\text{em}} - \text{ABS blank}_{\text{em}}) - (\text{ABS}_{\text{ref}} - \text{ABS blank}_{\text{ref}})$$

pri čemer je em = valovna dolžina emisije in ref = referenčna valovna dolžina.

31. Rezultat se šteje za pozitivnega, če je SI $\geq 1,6$ (10). Vendar se lahko pri odločanju, ali je mejni rezultat pozitiven (tj. vrednost SI med 1,6 in 1,9), uporabijo tudi moč odziva na odmerek, statistični pomen ter doslednost odzivov v topilu/nosilcu in pozitivni kontroli (3) (6) (32).
32. Pri mejnem pozitivnem odzivu s SI med 1,6 in 1,9 bodo uporabniki morda za potrditev, da so takšni rezultati pozitivni, poleg vrednosti SI upoštevali tudi moč odziva na odmerek, dokaze o sistemski toksičnosti ali statistični pomen (10). Upoštevati je treba tudi različne lastnosti preskusne snovi, vključno s strukturno podobnostjo z znanimi povzročitelji preobčutljivosti, povzročanjem čezmernega lokalnega draženja kože pri miši ter naravo opaženega odnosa med odmerkom in odzivom. Ti in drugi razlogi so podrobno obdelani drugje (4).

33. Zbiranje podatkov na ravni posamezne miši bo omogočilo statistično analizo prisotnosti in stopnje odnosa med odmerkom in odzivom v podatkih. Morebitna statistična ocena lahko vključuje oceno odnosa med odmerkom in odzivom ter ustrezno prilagojene primerjave preskusnih skupin (npr. skupina, ki je prejela odmerek v parih, proti primerjavam primerjalnih kontrolnih skupin s topilom/nosilcem). Statistična analiza lahko obsega npr. linearno regresijo ali Williamsov preskus za oceno nihanj odziva na odmerek in Dunnettov preskus za primerjave po parih. Pri izbiri ustrezne metode statistične analize se mora raziskovalec zavedati možnih neenakosti varianc in drugih sorodnih problemov, zaradi katerih je lahko nujna pretvorba podatkov ali neparametrski statistični analiza. V vsakem primeru bo moral raziskovalec morda izvesti izračune stimulacijskega indeksa in statistične analize s podatkovnimi točkami (včasih imenovanimi 'izločitve') in brez njih.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

34. Podatki se povzamejo v obliki preglednice, ki prikazuje vrednosti indeksa označevanja za BrdU, skupinsko povprečje indeksa označevanja za BrdU/žival, s tem povezane napake (npr. SD, SEM) in povprečni SI za vsako skupino odmerka v primerjavi s primerjalno kontrolno skupino s topilom/nosilcem.

Poročilo o preskusu

35. Poročilo o preskusu vsebuje naslednje informacije:

preskusne in kontrolne kemikalije:

- identifikacijske podatke (npr. številko CAS in številko EC, če je na voljo; vir; čistost; znane nečistoče, številko serije),
- fizikalno stanje in fizikalno-kemijske lastnosti (npr. hlapnost, stabilnost, topnost),
- če je zmes, sestavo in relativne odstotke sestavin;

topilo/nosilec:

- identifikacijske podatke (čistost, po potrebi koncentracijo, uporabljeno količino),
- utemeljitev izbire uporabljenega nosilca;

preskusne živali:

- vir miši seva CBA,
- mikrobiološki status živali, če je znan,
- število in starost živali,
- število, starost in spol živali;

preskusni pogoji:

- vir, številko serije in podatke proizvajalca glede zagotavljanja kakovosti/nadzora kakovosti (občutljivost na protitelesa in specifičnost ter mejo zaznavnosti) kompleta za encimsko-imunski test,
- podatke o pripravi in uporabi preskusne snovi,
- utemeljitev izbire odmerka (vključno z rezultati predhodnega presejalnega preskusa, če je bil izveden),
- uporabljene koncentracije nosilca in preskusne snovi in skupno količino uporabljenih preskusnih snovi,
- podatke o kakovosti hrane in vode (vključno z vrsto/virom prehranjevanja, virom vode),
- podatke o programih tretiranja in vzorčenja,
- metode merjenja toksičnosti,

- merila za obravnavanje študij kot pozitivnih ali negativnih,
- podrobnosti o morebitnih odstopanjih protokola in pojasnilo, kako odstopanje vpliva na zasnovo študije in njene rezultate;

preverjanje zanesljivosti:

- povzetek rezultatov zadnjega preverjanja zanesljivosti, vključno z informacijami o uporabljeni preskusni snovi, koncentraciji in nosilcu,
- primerjalne in/ali pretekle pozitivne in primerjalne negativne (topilo/nosilec) kontrolne podatke za preskuševalni laboratorij,
- če primerjalna pozitivna kontrola ni bila vključena, datum in laboratorijsko poročilo nazadnje izvedene redne pozitivne kontrole in poročilo, ki navaja pretekle pozitivne kontrolne podatke za laboratorij, na podlagi katerih je upravičeno neizvajanje primerjalne pozitivne kontrole;

rezultati:

- posamezne mase živali na začetku odmerjanja in ob predvideni humani usmrtnitvi; ter povprečno in povezano napako (npr. SD, SEM) za vsako tretirano skupino,
- časovni potek začetka toksičnosti in njenih znakov, vključno z morebitnim draženjem kože na mestu dajanja za vsako žival,
- preglednico s kazalniki označevanja za BrdU za vsako posamezno miš in vrednosti SI za vsako tretirano skupino,
- povprečno in povezano napako (npr. SD, SPM) za indeks označevanja za BrdU/miš za vsako tretirano skupino,
- izračunan SI in ustrezno merilo spremenljivosti, ki upošteva spremenljivost med posameznimi živalmi tako v preskusni snovi kot kontrolnih skupinah,
- odnos med odmerkom in odzivom,
- po potrebi, statistične analize;

razprava o rezultatih:

- kratke pripombe o rezultatih, analizo odziva na odmerek in po potrebi statistične analize, s sklepom, ali naj se preskusna snov šteje za povzročitelja preobčutljivosti kože.

VIRI

1. OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Na voljo na spletni strani: <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, 327–33.
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. Na voljo na spletni strani: 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. Na voljo na spletni strani: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm>.
11. (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. Na voljo na spletni strani: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRpt2009.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. Na voljo na spletni strani: <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. Na voljo na spletni strani: 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. Na voljo na spletni strani: <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. Na voljo na spletni strani: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/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. Na voljo na spletni strani: 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. Na voljo na spletni strani: <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, 563–79.
33. OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Na voljo na spletni strani: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Natančnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode z uveljavljenimi referenčnimi vrednostmi. To je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz 'skladnost' se pogosto izmenično uporabljata za pomen deleža ustreznih rezultatov preskusne metode (33).

Primerjalna snov: snov, ki povzroča preobčutljivost ali je ne povzroča in se uporablja kot standard za primerjavo s preskusno snovjo. Primerjalna snov mora imeti naslednje lastnosti: (i) trajen in zanesljiv vir; (ii) strukturno in funkcijsko podobnost z razredom preskušanih snovi; (iii) znane fizikalno-kemijske lastnosti; (iv) podporne podatke o znanih učinkih in (v) znano učinkovitost v razponu zelene reakcije.

Lažno negativna snov: preskusna snov, ki je s preskusno metodo nepravilno opredeljena kot negativna ali neaktivna, čeprav je dejansko pozitivna ali aktivna (33).

Lažno pozitivna snov: preskusna snov, ki je s preskusom nepravilno opredeljena kot pozitivna ali aktivna, čeprav je dejansko negativna ali neaktivna (33).

Nevarnost: možnost škodljivega učinka na zdravje ali okolje. Do škodljivega učinka pride, če je raven izpostavljenosti dovolj visoka.

Ponovljivost v laboratorijih: merjenje obsega, v katerem lahko različni kvalificirani laboratoriji, ki uporabljajo isti protokol in preskušajo iste preskusne snovi, pridejo do kvalitativno in kvantitativno podobnih rezultatov. Ponovljivost v laboratorijih se ugotovi med postopki pred validacijo in med validacijo ter kaže, v kakšnem obsegu se lahko preskus uspešno uporablja v več laboratorijih; imenuje se tudi ponovljivost v različnih laboratorijih (33).

Ponovljivost v laboratoriju: določitev, obsega, v katerem lahko kvalificirane osebe v istem laboratoriju uspešno ponovijo rezultate z uporabo določenega protokola v različnem času. Imenuje se tudi ponovljivost znotraj laboratorija (33).

Izločitev: izločitev je ugotovitev, ki se izrazito razlikuje od drugih vrednosti v naključnem vzorcu populacije.

Zagotavljanje kakovosti: postopek upravljanja, pri katerem posamezniki, neodvisni od oseb, ki so izvajale preskuse, ocenijo izpolnjevanje laboratorijskih standardov za preskušanje, zahtev in postopkov vodenja evidenc ter natančnosti prenosa podatkov.

Zanesljivost: stopnja ponovljivosti preskusne metode v laboratorijih in med njimi v določenem časovnem obdobju pri uporabi istega protokola. Ocenijo se z izračunom ponovljivosti v enem ali več laboratorijih (33).

Preobčutljivost kože: imunološki proces, ki se pojavi, ko je občutljiv posameznik lokalno izpostavljen kemičnemu alergen, ki na koži sproži imunski odziv in lahko povzroči razvoj preobčutljivosti ob stiku.

Stimulacijski indeks (SI): vrednost, izračunana za oceno morebitne preobčutljivosti kože, ki jo lahko povzroči preskusna snov; je razmerje med množenjem v tretiranih skupinah in množenjem v primerjalni kontrolni skupini z nosilcem.

Preskusna snov (imenovana tudi *preskusna kemikalija*): katera koli snov ali zmes, preskušana z uporabo te preskusne metode.“
