

II

(Icke-lagstiftningsakter)

FÖRORDNINGAR

KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EU) nr 640/2012

av den 6 juli 2012

om ändring, för anpassning till den tekniska utvecklingen, av förordning (EG) nr 440/2008 om testmetoder enligt Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach)

(Text av betydelse för EES)

EUROPEISKA KOMMISSIONEN HAR ANTAGIT DENNA
FÖRORDNING

med beaktande av fördraget om Europeiska unionens funktions-
sätt,

med beaktande av Europaparlamentets och rådets förordning nr 1907/2006 av den 18 december 2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach), inrättande av en europeisk kemikaliemyndighet, ändring av direktiv 1999/45/EG och upphävande av rådets förordning (EEG) nr 793/93 och kommissionens förordning (EG) nr 1488/94 samt rådets direktiv 76/769/EEG och kommissionens direktiv 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG och 2000/21/EG⁽¹⁾, särskilt artikel 13.3, och

av följande skäl:

(1) I kommissionens förordning (EG) nr 440/2008⁽²⁾ fastställs testmetoder som ska användas för tillämpning av förordning (EG) nr 1907/2006 när det gäller bestämning av ämnens fysikalisk-kemiska egenskaper, toxicitet och ekotoxicitet.

(2) Det är nödvändigt att uppdatera förordning (EG) nr 440/2008 för att med prioritet införa nya och uppdaterade testmetoder som nyligen har antagits av OECD, i syfte att minska användningen av djur för försöksändamål, i enlighet med Europaparlamentets och rådets direk-

tiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål⁽³⁾ och rådets direktiv 86/609/EEG av den 24 november 1986 om tillnärmning av medlemsstaternas lagar och andra författningar om skydd av djur som används för försök och andra vetenskapliga ändamål⁽⁴⁾. Samråd har förts med berörda parter om detta utkast.

(3) Förordning (EG) nr 440/2008 bör därför ändras i enlighet med detta.

(4) De åtgärder som föreskrivs i denna förordning är förenliga med yttrandet från den kommitté som inrättats genom artikel 133 i förordning (EG) nr 1907/2006.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Bilagan till förordning (EG) nr 440/2008 ska ändras i enlighet med bilagan till den här förordningen.

Artikel 2

Denna förordning träder i kraft den tredje dagen efter det att den har offentliggjorts i *Europeiska unionens officiella tidning*.

⁽¹⁾ EUT L 396, 30.12.2006, s. 1.

⁽²⁾ EUT L 142, 31.5.2008, s. 1.

⁽³⁾ EUT L 276, 20.10.2010, s. 33.

⁽⁴⁾ EGT L 358, 18.12.1986, s. 1.

Denna förordning är till alla delar bindande och direkt tillämplig i alla medlemsstater.

Utfärdad i Bryssel den 6 juli 2012.

På kommissionens vägnar
José MANUEL BARROSO
Ordförande

BILAGA

Bilagan till förordning (EG) nr 440/2008 ska ändras på följande sätt:

1. Kapitel B.42 ska ersättas med följande:

"B.42. HUDSENSIBILISERING: LLNA-METODEN (LOCAL LYMPH NODE ASSAY)

INLEDNING

1. OECD:s riktlinjer för testning av kemikalier (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals) och EU:s testmetoder baserade på dem ses regelbundet över med hänsyn till den vetenskapliga utvecklingen, nya lagstiftningsbehov och djurens välbefinnande. Den ursprungliga testmetoden för bestämning av hudsensibilisering hos möss, LLNA-metoden (OECD:s testriktlinje 429, kapitel B.42 i denna bilaga), har antagits tidigare (1). Närmare uppgifter om valideringen av LLNA-metoden och en granskning av arbetet i samband med denna har offentliggjorts (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Den uppdaterade LLNA-metoden grundar sig på utvärderingen av experimentella och vetenskapliga uppgifter (12). Detta är den andra testmetoden som tas fram för bedömning av kemikaliers (ämnens och blandningars) potential att framkalla hudsensibilisering hos djur. Den gamla testmetoden (dvs. OECD:s testriktlinje 406, kapitel B.6 i denna bilaga) omfattar test på marsvin, särskilt maximeringstest på marsvin och Buehler-test (13). Jämfört med B.6 och OECD:s testriktlinje 406 (13) har LLNA fördelar när det gäller djurens välbefinnande. Den uppdaterade LLNA-testmetoden omfattar en uppsättning prestandastandarder (tillägg 1) som kan användas för att utvärdera valideringsstatus för nya och/eller modifierade testmetoder som är funktionellt och mekaniskt likartade med LLNA, enligt principerna i OECD:s riktlinjedokument nr 34 (14).
2. LLNA används för att undersöka hudsensibiliseringens induktionsfas, vilket ger tillgång till kvantitativa data som är lämpliga för dos-responsbedömning. Här bör noteras att de ämnen som har milda till moderata sensibiliseringsegenskaper och som anses vara lämpliga som positivt kontrollämne för testmetoder med marsvin (dvs. B.6, OECD:s testriktlinje 406) (13), även är lämpliga för LLNA-metoden (6) (8) (15). Inom denna testmetod beskrivs också en variant som kallas reducerat LLNA-test (rLLNA), med upp till 40 procent färre djur (16) (17) (18). Denna variant kan användas när det finns lagstiftade krav på att bekräfta negativ förutsägelse för hudsensibiliserande potential, förutsatt att alla andra LLNA-protokollspecifikationer följs enligt beskrivningen av denna testmetod. Förutsägelsen av negativt resultat ska bygga på tillgänglig information enligt beskrivningen i punkt 4. För tillämpning av rLLNA krävs klara motiveringar och vetenskapliga belägg. Om det mot förmodan uppstår positiva eller tvetydiga resultat med rLLNA kan det krävas ytterligare testning för att tolka eller förtydliga resultaten. Varianten rLLNA bör inte användas för faroidentifiering av hudsensibiliserande testämnen i fall där dos-responsinformation behövs, t.ex. vid underklassificering för förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar och Förenta nationernas globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier.

DEFINITIONER

3. Definitioner av begreppen finns i tillägg 2.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

4. LLNA är en alternativ metod för identifiering av hudsensibiliserande kemikalier. Detta betyder dock inte nödvändigtvis att LLNA alltid ska användas i stället för test på marsvin (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406) (13), utan att LLNA-metoden är likvärdig och kan användas som ett alternativ i fall där positiva och negativa resultat i regel inte kräver någon ytterligare bekräftelse. Testningslaboratoriet bör analysera all tillgänglig information om testämnet innan själva testningen genomförs. Denna information omfattar ämnets identitet och kemiska struktur, fysikalisk-kemiska egenskaper, resultaten från andra eventuella *in vitro*- eller *in vivo*-test avseende toxicitet samt toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier. Med stöd av denna information bör man överväga om LLNA-metoden är lämplig för ämnet (med tanke på att metoden inte kan användas för vissa typer av kemikalier, se punkt 5) och använda informationen som hjälp vid valet av dos.
5. LLNA är en *in vivo*-metod, och av detta följer att man måste använda djur för att bedöma sensibilisering genom allergisk kontakt. Metoden ger dock möjligheter att minska antalet djur. Dessutom ger LLNA möjlighet till bättre behandling av djuren (mindre smärta och lidande) vid test avseende sensibilisering genom allergisk kontakt. LLNA baserar sig på observationer av immunologiska händelser som stimuleras av kemikalier under sensibiliseringens induktionsfas. Till skillnad från test på marsvin (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406) (13) kräver LLNA inte framkallning av provokationsinducerade dermala hypersensitivetsreaktioner. Dessutom behöver adjuvant inte användas, vilket är fallet vid maximeringstest på marsvin (13). LLNA är därför en mindre plågsam metod för djuren. Trots LLNA-metodens fördelar jämfört med B.6 och OECD:s testriktlinje 406 bör man vara medveten om att LLNA har vissa begränsningar. Det kan därför i vissa fall vara nödvändigt att använda B.6 eller OECD:s testriktlinje 406 (13) (t.ex. falska negativa fynd med LLNA för vissa metaller eller falska positiva fynd för vissa hudirriterande ämnen [såsom vissa yttaktiva kemikalier] (19) (20) eller testämnets löslighet). Därutöver gäller att kemiska klasser eller ämnen vars funktionella grupper har påvisats agera som potentiella störfaktorer (21) kan göra det nödvändigt att använda test på marsvin (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406) (13). På grund av den begränsade valideringsdatabasen, som primärt bestod av växtskyddsmedelsformuleringar, är det mer sannolikt att LLNA i jämförelse med

test på marsvin ger positivt resultat för dessa typer av testämnen (22). Vid testning av formuleringar kan man dock överväga att även använda liknande ämnen med kända resultat som referensämnen för att påvisa att LLNA-metoden fungerar tillfredsställande (se punkt 16). När dessa identifierade begränsningar räknas bort bör LLNA gå att använda för testning av alla ämnen, utom om ett ämne förknippas med egenskaper som kan påverka LLNA-metodens exakthet.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

6. LLNA bygger på principen om att sensibiliserande ämnen inducerar en primär proliferation av lymfocyter i de lymfnoder som dränerar det område där testämnet appliceras. Denna proliferation står i proportion till den applicerade dosen och det allergiframkallande ämnets styrka, och är ett enkelt sätt att få en kvantitativ mätning av sensibiliseringen. Proliferationen mäts genom att jämföra medelproliferationen i varje testgrupp med medelproliferationen i den vehikelbehandlade kontrollgruppen. Förhållandet mellan medelproliferationen i respektive behandlingsgrupp och den parallella vehikelkontrollgruppen, kallat stimulationsindex (SI), bestäms och detta bör vara ≥ 3 för att det ska vara motiverat att klassificera testämnet som potentiellt hudsensibiliserande ämne. De förfaranden som beskrivs här grundar sig på radioaktiv märkning *in vivo* för mätning av ett ökat antal prolifererande celler i de aurikulära dränerande lymfnoderna. Det går dock också att använda andra slutpunkter för bedömning av antalet prolifererande celler, förutsatt att kraven enligt prestandastandarderna uppfylls till fullo (tillägg 1).

TESTBESKRIVNING

Val av djurart

7. För detta test används mus. I testet används unga vuxna mushonor av stammen CBA/Cirka eller CBA/J som inte har fått ungar och som inte är dräktiga. När försöket inleds bör djuren vara 8–12 veckor gamla. Djurens viktvariation bör vara minimal och får inte överskrida 20 % av medelvikten. Övriga stammar eller hanar kan användas som alternativ förutsatt att det finns tillräckliga data som stöd för att det inte förekommer några betydande stam- eller könsberoende skillnader i LLNA-respons.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

8. Mössen ska inhysas i grupper (23), utom om det finns tillbörlig vetenskaplig motivering för individuell inhysning. Temperaturen i testdjurens utrymme bör vara 22 ± 3 °C. Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målvärdet bör dock vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas och djuren bör ha obegränsad tillgång till dricksvatten.

Förberedelse av djuren

9. Djuren väljs ut slumpmässigt och förses med märkning så att de kan identifieras individuellt (örönmärkning får dock inte användas). Därefter får djuren akklimatisera sig till laboratoriets betingelser i sina burar i minst fem dagar före doseringsstart. Innan behandlingen inleds undersöks alla djur för att säkerställa att de inte har synliga hudskador.

Beredning av doseringslösningar

10. Kemikalier i fast form ska upplösas eller suspenderas i lösningsmedel/vehikel och vid behov spädas ut före appliceringen på mössens öron. Kemikalier i vätskeform kan appliceras i ren eller utspädd form. Olösliga kemikalier, av den typ som ofta används i medicintekniska produkter, ska extraheras kraftigt i lämpligt lösningsmedel så att alla extraherbara beståndsdelar för testning fås ut före appliceringen på mössens öron. Testlösningarna ska beredas dagligen utom om stabilitetsdata visar att lagring kan accepteras.

Tillförlitlighetskontroll

11. Positiva kontrollkemikalier används för att påvisa att testsystemet har tillräcklig och reproducerbar känslighet för ett sensibiliserande testämne och att responsen har välkaraktäriserad styrka. Användning av en parallell positiv kontroll rekommenderas eftersom den påvisar laboratoriets kompetens att genomföra testningar på ett framgångsrikt sätt och ger möjlighet att bedöma reproducerbarhet och jämförbarhet inom laboratoriet och mellan laboratorier. Även vissa tillsynsmyndigheter kräver att positiv kontroll används för varje testning och därför uppmuntras användarna att tillfråga relevanta myndigheter innan testning med LLNA-metoden genomförs. Likaså uppmuntras rutin användning av parallell positiv kontroll för att undvika tilläggstestning på djur i fall där myndigheterna inte godkänner periodiska positiva kontroller (se punkt 12). Den positiva kontrollen bör ge en positiv LLNA-respons på den exponeringsnivå som förväntas ge en ökning av stimulationsindex (SI) större än 3 jämfört med den negativa kontrollgruppen. Den positiva kontrollkemikaliens dos ska väljas så att den inte orsakar särskilt kraftig

hudirritation eller systemisk toxicitet och att induktionen är reproducerbar men inte för kraftig (dvs. SI > 20 är ett för högt värde). Rekommenderade ämnen är 25-procentig hexylkanelaldehyd (CAS nr 101-86-0) i aceton-olivoljeblandning i förhållandet 4:1 (volym/volym) och 5-procentig merkaptobenzotiazol (CAS nr 149-30-4) i N,N-dimetylformamid (se tillägg 1, tabell 1). I vissa fall kan även andra positiva kontrollkemikalier som uppfyller ovan angivna kriterier användas, förutsatt att tillbörlig motivering ges.

12. Trots att parallell positiv kontrollgrupp rekommenderas kan det finnas betingelser där det är tillräckligt med periodisk testning (dvs. minst var sjätte månad) av den positiva kontrollen – detta gäller laboratorier som regelbundet genomför LLNA (dvs. minst en gång i månaden) och har en etablerad historisk databas över positiva kontroller som påvisar laboratoriets förmåga att få reproducerbara och exakta resultat från dem. Tillräcklig kvalitet hos LLNA kan framgångsrikt påvisas genom enhetliga positiva resultat med den positiva kontrollen vid minst tio oberoende testningar som genomförs inom en skälig tidsperiod (kortare än ett år).
13. Parallell positiv kontrollgrupp ska alltid användas vid ändringar rörande testningsförfarandet (t.ex. ny personal, nya material och/eller reagenser, annorlunda utrustning, byte av testdjurens ursprung), och sådana ändringar bör dokumenteras i laboratorierapporter. Man bör överväga om dessa ändringar påverkar den tidigare etablerade historiska databasens lämplighet, för att kunna avgöra om det behövs en ny historisk databas för dokumentering av den positiva kontrollens resultatenhetlighet.
14. Man bör vara medveten om att beslut om att testa positiva kontroller med vissa intervaller i stället för parallellt har återverkningar på lämpligheten och godtagbarheten hos negativa undersökningsresultat som fås utan parallell positiv kontroll under den tid som löper mellan de periodiska testningarna av positiv kontroll. Om t.ex. falska negativa resultat fås vid ett periodiskt test av positiv kontroll, måste man kanske ifrågasätta resultat som erhållits mellan det sista godtagbara periodiska testet med positiv kontroll och ett icke-godtagbart periodiskt test med positiv kontroll. Följderna av dessa utfall bör övervägas noggrant när man avgör huruvida parallella positiva kontroller ska användas eller om de positiva kontrollerna enbart ska vara periodiska. Likaså bör man överväga att använda färre djur i den parallella positiva kontrollgruppen när detta är vetenskapligt motiverat och laboratoriet med stöd av laboratoriespecifika historiska data kan påvisa att detta är gångbart (12).
15. Även om det positiva kontrollämnet bör testas i en vehikel som vederligen framkallar enhetlig respons (t.ex. aceton-olivoljeblandning i förhållandet 4:1 [volym/volym]), kan det förekomma vissa föreskriftsreglerade situationer där det även krävs testning i en icke-standardmässig vehikel (kliniskt och kemiskt relevant formulering) (24). Om det parallella positiva kontrollämnet testas i en annan vehikel än den som används för testämnet, bör en separat vehikelkontrollgrupp användas för den parallella positiva kontrollen.
16. I fall där utvärdering görs av testämnen av en viss kemisk klass eller med en viss responsskala kan det också vara värdefullt med referensämnen för att påvisa att testmetoden fungerar tillfredsställande för bestämning av hudsensibiliseringspotentialen hos dessa typer av testämnen. Ett lämpligt referensämne ska ha följande egenskaper:
 - Strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas.
 - Kända fysikalisk-kemiska egenskaper.
 - Stödande data från LLNA.
 - Stödande data från andra djurmodeller och/eller från människor.

TESTFÖRFARANDE

Antalet djur och dosnivåer

17. Det ska finnas minst fyra djur per dosgrupp och minst tre koncentrationer av testämnet. Det ska också finnas en parallell negativ kontrollgrupp som endast behandlas med samma vehikel som används för testämnet och en positiv kontroll (parallell eller nyligen gjord periodisk kontroll, i enlighet med laboratoriets principer rörande punkterna 11–14). Man bör överväga flera doser av det positiva kontrollämnet, särskilt när den positiva kontrollen testas periodiskt. Med undantag för behandling med testämnet bör djuren i kontrollgrupperna hanteras på exakt samma sätt som djuren i dosgrupperna.

18. Doserna och vehikeln bör väljas på grundval av rekommendationerna i hänvisningarna (3) och (5). Doserna väljs i regel enligt en lämplig koncentrationsserie såsom 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % osv. Valet av koncentrationsserie ska ges tillbörlig vetenskaplig motivering. All existerande tillgänglig och relevant toxikologisk information (t.ex. akut toxicitet och hudirritation) samt strukturell och fysikalisk-kemisk information om testämnet (och/eller strukturellt besläktade ämnen) bör beaktas när man väljer de tre på varandra följande koncentrationerna så att den högsta koncentrationen ger maximal exponering samtidigt som systemisk toxicitet och särskilt kraftig lokal hudirritation undviks (3) (25). Om sådan information inte finns kan det vara nödvändigt med ett preliminärt screeningtest (se punkterna 21–24).
19. Vehikeln får inte störa eller snedvridera testresultaten och ska väljas med tanke på största möjliga löslighet och därmed högsta möjliga koncentration samtidigt som lösningen/suspensionen ska vara lämplig för applicering av testämnet. Som vehikel rekommenderas aceton-olivoljeblandning (4:1 volym/volym), *N,N*-dimetylformamid, metyletylketon, propylenglykol och dimetylsulfoxid (19) men även andra vehiklar kan användas förutsatt att tillräcklig vetenskaplig motivering kan ges. I vissa situationer kan det vara nödvändigt att som extra kontroll använda ett kliniskt relevant lösningsmedel eller en kommersiellt tillgänglig blandning där testämnet ingår. Särskild vikt bör fästas vid att se till att hydrofila testämnen inkorporeras i ett vehikelsystem som väter huden och som inte omedelbart rinner bort, genom att använda lämpliga solubilisering ämnen (t.ex. 1-procentig Pluronic® L92). Det betyder att helt vattenbaserade vehiklar bör undvikas.
20. Genom analys av lymfnoder från individuella möss kan man bestämma variationer djuren emellan och göra en statistisk jämförelse av skillnaden mellan mätningar för testämnet och mätningarna i vehikelkontrollgruppen (se punkt 35). Möjligheten att minska antalet möss i den positiva kontrollgruppen finns endast när data samlas in individuellt per djur (12). Vidare gäller att vissa tillsynsmyndigheter kräver att data insamlas individuellt. Vissa tillsynsmyndigheter kan godkänna poolade djurdata och då kan man välja mellan att samla in djurdata individuellt eller poolat.

Preliminärt screeningtest

21. Om det inte finns information som grund för att bestämma högsta testdosen (se punkt 18) bör man göra ett preliminärt screeningtest för att definiera den lämpliga dosnivån för LLNA. Syftet med det preliminära screeningtestet är att få vägledning för valet av högsta dosnivå i huvudundersökningen, i fall där information saknas om vilken koncentration som inducerar systemisk toxicitet (se punkt 24) och/eller särskilt kraftig lokal hudirritation (se punkt 23). Den högsta dosnivå som testas ska vara 100 % testämne för vätskor eller högsta möjliga koncentration för fasta ämnen eller suspensioner.
22. Det preliminära screeningtestet genomförs under identiska betingelser som huvudundersökningen, utom att proliferationen i lymfnoderna inte utvärderas och dosgruppen kan ha lägre antal djur. Ett eller två djur per dosgrupp föreslås. Alla möss observeras dagligen för kliniska tecken på systemisk toxicitet eller lokal irritation på appliceringsstället. Djurens kroppsvikt registreras före testningen och efter avslutad testning (dag 6). På varje mus observeras båda öronens hudrodnad och graderas enligt tabell 1 (25). Mätning av örontjocklek görs t.ex. med digital mikrometer eller Peacock Dial-instrument på dag 1 (före dosering), dag 3 (cirka 48 timmar efter den första dosen) och på dag 6. Dessutom kan örontjockleken bestämmas på dag 6 genom vägning av en öronbit som stansats ut efter skonsam avlivning. Särskilt kraftig lokal hudirritation indikeras genom gradering ≥ 3 för hudrodnad och/eller ökning av örontjockleken med ≥ 25 % på någon av mätningdagarna (26) (27). Den högsta dos som väljs för huvudundersökningen blir nästa lägre dos i den preliminära screeningens koncentrationsserie (se punkt 18) som inte inducerar systemisk toxicitet och/eller särskilt kraftig hudirritation.

Tabell 1

Gradering av hudrodnad

Observation	Gradering
Ingen hudrodnad	0
Mycket svag hudrodnad (knappt skönjbar)	1
Väldefinierad hudrodnad	2
Moderat till svår hudrodnad	3
Svår hudrodnad (köttrrodnad) till sårskorpebildning som utgör hinder för gradering av rodnaden	4

23. För identifiering av irriterande ämnen med LLNA har man utöver en 25-procentig ökning av örontjocklek (26) (27) också använt statistiskt signifikant ökning av örontjockleken hos behandlingsgruppens möss i jämförelse med kontrollgruppens möss (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Det kan dock uppstå statistiskt signifikanta öknings av örontjocklek som är mindre än 25 %, men dessa har inte specifikt förknippats med särskilt kraftig irritation (30) (32) (33) (34).
24. Följande kliniska observationer kan indikera systemisk toxicitet (35) (36) när de används som del av en helhetsbedömning och kan således ge indikation om den högsta dosnivå som ska användas i huvudundersökningen: ändringar av nervsystemets funktion (t.ex. upprest päls, ataxi, skälvnningar och konvulsioner), ändringar av beteende (t.ex. aggressivitet, ändringar av putsningsbeteende, markerad ändring av aktivitetsnivå), ändringar av andningsmönster (dvs. ändringar av andningens frekvens och intensitet, såsom dyspné, gäspande och rassel) samt ändringar av födo- och vattenintag. Vid utvärderingen ska man också beakta tecken på letargi och/eller avsaknad av reaktioner, alla slags kliniska tecken på mer än lätt eller momentan smärta eller lidande, minskning av kroppsvikten med mer än 5 % från dag 1 till dag 6 samt mortalitet. Döende djur och djur som visar tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande ska avlivas skonsamt (37).

Huvudundersökningens försöksschema

25. Försöksschemat är upplagt enligt följande:

- *Dag 1:* Djuren märks individuellt och vikt samt eventuella kliniska observationer registreras. Applicera 25 µl lämpligt utspätt testämne, ren vehikel eller positivt kontrollämne (parallell eller nyligen utförd positiv kontroll, i enlighet med laboratoriets principer när det gäller punkterna 11–15) på båda öronens baksida.
- *Dagarna 2 och 3:* Upprepa applicering enligt dag 1.
- *Dagarna 4 och 5:* Ingen behandling.
- *Dag 6:* Registrera varje djurs vikt. Injicera 250 µl steril fosfatbuffrad saltlösning (PBS) som innehåller 20 µCi ($7,4 \times 10^5$ Bq) tritierad (^3H)-metyltymidin i alla test- och kontroldjur via svansvenen. Alternativt kan 250 µl steril PBS som innehåller 2 µCi ($7,4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I -jododeoxiuridin och 10^{-5}M fluorodeoxiuridin injiceras i alla testdjur via svansvenen. Avliva djuren skonsamt efter fem timmar. Skär bort de aurikulära dränerande lymfnoderna från varje öra och behandla dem tillsammans i PBS för varje djur (metoden med individuellt djur), eller skär bort lymfnoderna från varje öra och poola dem i PBS för varje behandlingsgrupp (metoden med poolad behandlingsgrupp). Närmare uppgifter och scheman för identifiering och dissekering av noder finns i hänvisning (12). För ytterligare kontroll av lokal hudrespons i huvudundersökningen kan tilläggsparametrar såsom gradering av örats hudrodnad eller mätningar av örats tjocklek (med tjockleksmätare eller genom vägning av utstansad bit vid obduceringen) införlivas i undersökningsprotokollet.

Beredning av cellsuspensioner

26. En suspension med enskilda celler bestående av lymfnodsceller (LNC) bilateralt utskurna från individuella djur eller från poolade behandlingsgrupper bereds genom försiktig mekanisk sönderdelning med hjälp av ett nät av rostfritt stål (200 mesh) eller annan godkänd teknik för beredning av en suspension med enskilda celler. Lymfnodscellerna tvättas två gånger med ett överskott PBS och DNA fälls ut med 5-procentig triklorättiksyra (TCA) vid 4 °C under 18 timmar (3). Fällningen återupplöses i 1 ml TCA och överförs till skintillationskäril med 10 ml skintillationsvätska för ^3H -räkning eller överförs direkt till gammarräkningsrör för ^{125}I -räkning.

Bestämning av cellproliferationen (radioaktivt innehåll)

27. Innehållet av ^3H -metyltymidin bestäms genom β -skintillationsräkning såsom sönderfallet per minut (DPM). Innehållet av ^{125}I -jododeoxiuridin bestäms genom ^{125}I -räkning och uttrycks även som DPM. Beroende på vilken metod som har valts uttrycks innehållet som DPM/djur (metod med individuella djur) eller DPM/behandlingsgrupp (metod med poolning).

Reducerat LLNA (rLLNA)

28. I situationer där det finns lagstiftade krav på att bekräfta negativ förutsägelse för hudsensibiliserande potential kan man använda rLLNA (16) (17) (18), dvs. ett protokoll med färre djur, förutsatt att alla andra LLNA-protokollspecifikationer följs enligt beskrivningen för denna testmetod. För användning av rLLNA krävs klara motiveringar och vetenskapliga belägg. Om resultaten är positiva eller tveksamma kan det krävas ytterligare testning för att tolka eller förtydliga dem.

29. Minskningen av antalet dosgrupper är den enda skillnaden mellan LLNA och rLLNA och den medför att man inte får information om dos-responsförhållande. Därför ska rLLNA inte användas om sådan information krävs. På samma sätt som med flerdos-LLNA ska testämneskoncentrationen för rLLNA vara den högsta koncentration som inte inducerar systemisk toxicitet och/eller lokal hudirritation hos mössen (se punkt 18).

OBSERVATIONER

Kliniska observationer

30. Varje mus bör observeras minst dagligen med tanke på eventuella kliniska tecken – lokal irritation vid appliceringsstället eller tecken på systemisk toxicitet. Alla observationer registreras systematiskt, med individuella registreringar för varje mus. Övervakningsplanerna bör inbegripa kriterier för omedelbar identifiering av tecken på systemisk toxicitet, särskilt kraftig hudirritation eller hudkorrosion så att berörda djur kan avlivas (37).

Kroppsvikt

31. Enligt det som anges i punkt 25 ska de individuella djurens vikt registreras vid testets början och strax före den schemalagda avlivningen.

BERÄKNING AV RESULTATEN

32. Resultaten för varje behandlingsgrupp uttrycks som stimulationsindex. När metoden med individuella djur används erhålls stimulationsindex genom att genomsnittligt DPM/djur inom varje testämnesgrupp och den positiva kontrollgruppen divideras med genomsnittligt DPM/djur för lösningsmedels-/vehikelkontrollgruppen. Värdet på genomsnittligt stimulationsindex för vehikelkontrollgrupperna är då 1. När poolning används erhålls stimulationsindex genom att dividera det poolade radioaktiva innehållet för varje testämnesgrupp med innehållet i den poolade vehikelkontrollgruppen, och resultatet är det genomsnittliga stimulationsindexet.
33. Ett resultat anses vara positivt när stimulationsindex ≥ 3 . Man kan dock även använda dosresponsens styrka samt den statistiska signifikansen och enhetligheten hos responsen i kontrollgruppen för lösningsmedel/vehikel och i den positiva kontrollen när man fastställer huruvida ett gränsresultat ska anses vara positivt (4)(5)(6).
34. Vid behov kan de erhållna resultaten förtydligas ytterligare genom en granskning av testämnets olika egenskaper, inbegripet eventuell strukturell släktskap med kända hudsensibiliserande ämnen, huruvida ämnet orsakar särskilt kraftig lokal hudirritation hos mössen samt naturen hos det iakttagna dos-responsförhållandet. Dessa och andra aspekter diskuteras närmare i andra källor (7).
35. När radioaktivitetsdata samlas in för enskilda möss kan dessa data användas för en statistisk analys rörande förekomsten av dosrespons och graden av dos-responsförhållande. Alla statistiska analyser kan inbegripa en utvärdering av dos-responsförhållandet och en lämpligt anpassad jämförelse mellan testgrupper (t.ex. parvisa jämförelser mellan doseringsgrupp och parallell vehikelkontrollgrupp). De statistiska analyserna kan t.ex. innehålla linjär regression eller Williams test för utvärdering av dos-responstrender och Dunnetts test för parvisa jämförelser. Vid valet av lämplig metod för den statistiska analysen bör man vara medveten om eventuella olikheter hos varianserna och andra relaterade problem som kan göra det nödvändigt att göra en datatransformation eller en icke-parametrisk statistisk analys. Det kan också vara nödvändigt att genomföra beräkningar av stimulationsindex och statistiska analyser med och utan vissa datapunkter (s.k. outliers – utanföriggande värden).

DATA OCH RAPPORTERING

Data

36. Data ska sammanställas i tabellform. När metoden med individuella djur används anges DPM-värden per individuellt djur, gruppens medelvärde för DPM per djur, den associerade feltermen (t.ex. SD, SEM) och medelvärdet för stimulationsindex för varje dosgrupp jämfört med den parallella vehikelkontrollgruppen. När metoden med poolning används anges medel-/medianvärdet för DPM och medelvärdet för stimulationsindex för varje dosgrupp jämfört med den parallella vehikelkontrollgruppen.

Testrapport

37. Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

Test- och kontrollämnen:

- Identifieringsdata (t.ex. CAS-nummer och EG-nummer om dessa är kända, källa, renhet, kända orenheter, satsnummer).
- Fysikalisk natur och fysikalisk-kemiska egenskaper (t.ex. flyktighet, stabilitet, löslighet).

- För blandningar anges sammansättning och beståndsdelarnas relativa procentandelar.

Lösningsmedel/vehikel:

- Identifieringsdata (renhet, koncentration [om tillämpligt], volym som har använts).
- Motivering för val av vehikel.

Testdjur:

- CBA-mössens ursprung.
- Mikrobiologiska data för djuren, om dessa data är kända.
- Antal djur och deras ålder.
- Ursprung, inhysningsförhållanden, foder och dylikt.

Testbetingelser:

- Detaljerade uppgifter om beredning och applicering av testämnet.
- Motivering för valet av dos (även resultat från preliminär screening om sådan har genomförts).
- Koncentrationerna för vehikel och testämne samt totala mängden testämne som applicerats.
- Detaljerade uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet diettyp/källa, vattenkälla).
- Detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman.
- Metoder för mätningar av toxicitet.
- Kriterier för att fastställa om resultatet är positivt eller negativt.
- Uppgifter rörande eventuella avvikelser från protokollet och redogörelse för hur avvikelsen påverkar undersökningens utformning och resultat.

Tillförlitlighetskontroll:

- Sammanfattning av resultaten från senaste tillförlitlighetskontroll, inklusive information om testämne, koncentration och vehikel.
- Testningslaboratoriets data från parallella och/eller historiska positiva kontroller och negativa kontroller.
- Om försöket inte omfattade parallell positiv kontroll, ange datum och laboratorierapport för senaste periodiska positiva kontroll och en rapport med uppgifter om laboratoriets historiska data för positiva kontroller som motivering för varför parallell positiv kontroll inte har använts.

Resultat:

- Mössens individuella vikt vid doseringsstart och vid schemalagd avlivning, såväl som medelvärde och associerad felterm (t.ex. SD, SEM) för varje behandlingsgrupp.
- Tidpunkten för första upptäckt av tecken på toxicitet, även eventuell hudirritation vid appliceringsstället, för varje försöksdjur.
- En tabell med individuella värden per mus (metoden med individuella djur) eller medelvärde/medianvärde (metoden med poolning) och värden på stimulationsindex för varje behandlingsgrupp.

- Medelvärde och associerad felterm (t.ex. SD, SEM) för DPM per mus för varje behandlingsgrupp och resultaten från analys av utanförliggande värden för varje behandlingsgrupp när metoden med individuella djur används.
- Beräknat stimulationsindex och ett lämpligt mått på variabilitet som beaktar variationen djuren emellan både i testämneshgruppen och i kontrollgruppen när metoden med individuella djur används.
- Förhållandet mellan dos och respons.
- Statistisk analys, om tillämpligt.

Diskussion om resultaten:

- En kort kommentar om resultaten, dos-responsanalys och statistiska analyser (i tillämpliga fall), med en slutsats om huruvida testämnet ska anses vara hudsensibiliserande.

HÄNVISNINGAR

- (1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Finns på: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- (2) Kimber, I. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStd.pdf
- (13) OECD (1992), Skin Sensitisation. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Finns på: <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. Finns på: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- (15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. och 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. och 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. Finns på: 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 No 09–6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Finns på: <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. Finns på: 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. och 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. och 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 No 10–7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Finns på: <http://iccvam.niehs.nih.gov/>
- (23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 7:e uppl. 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. Finns på: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html
- (26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. och 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. Finns på: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fdLLNA/BRDcomplete.pdf>

- (28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. Finns på: <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, Finns på: 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. Finns på: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

Tillägg 1

Prestandastandarder för bedömning av föreslagna liknande eller modifierade LLNA-testmetoder för hudsensibilisering

INLEDNING

1. Syftet med prestandastandarder är att tillhandahålla en grund när man fastställer att nya testmetoder, både äganderättsligt skyddade (dvs. metoder med upphovsrätt, varumärke eller registrering) och allmänt tillgängliga metoder, är tillräckligt exakta och tillförlitliga för specifika testningsändamål. Dessa prestandastandarder, som grundar sig på validerade och godtagna testmetoder, kan användas för att utvärdera tillförlitligheten och exaktheten hos andra liknande metoder (vardagligt kallade 'me too'-test) som grundar sig på liknande vetenskapliga principer och som mäter eller förutser samma biologiska eller toxikologiska effekt (14).
2. Innan man antar modifierade metoder (dvs. föreslagna potentiella förbättringar av en godkänd testmetod) krävs en utvärdering för att fastställa de föreslagna ändringarnas inverkan på testets prestanda och i vilken utsträckning sådana förändringar påverkar den tillgängliga informationen för de andra komponenterna i valideringsprocessen. Beroende på de föreslagna ändringarnas antal och karaktär, genererade data och stödjande dokumentation för ändringarna, bör de antingen vara föremål för samma valideringsprocess som gäller för nya testmetoder eller, där det är lämpligt, för en begränsad bedömning av tillförlitlighet och relevans med användning av etablerade prestandastandarder (14).
3. När liknande eller modifierade metoder föreslås för användning inom denna testmetod bör deras tillförlitlighet och exakthet utvärderas med hjälp av kemikalier som representerar hela skalan av LLNA-utfall. För att omotiverad användning av djur ska undvikas rekommenderas starkt att de som utvecklar modeller först konsulterar lämpliga myndigheter innan valideringsstudier inleds enligt de prestandastandarder och den vägledning som anges i denna testmetod.
4. Dessa prestandastandarder baserar sig på de harmoniserade prestandastandarderna, US-ICCVAM (Förenta staterna), EC ECVAM (EG) och JaCVAM (Japan) (12), för utvärdering av validiteten hos liknande eller modifierade versioner av LLNA. Prestandastandarderna består av testmetodens grundläggande komponenter, rekommenderade referenskemikalier samt de standarder för exakthet och tillförlitlighet som en föreslagen metod minst måste uppfylla.

I. Testmetodens grundläggande komponenter

5. För att se till att liknande eller modifierade LLNA-metoder är funktionellt och mekaniskt analoga med LLNA och mäter samma biologiska verkan, måste testmetodprotokollet innehålla följande komponenter:

- Testämnet ska appliceras på mössens båda öron.
- Proliferationen av lymfocyter ska mätas i de lymfnoder som dränerar det område där testämnet appliceras.
- Proliferationen av lymfocyter ska mätas under hudsensibiliseringens induktionsfas.
- Den högsta dosen som väljs för ett testämne ska vara den högsta koncentrationen som inte inducerar systemisk toxicitet och/eller särskilt kraftig lokal hudirritation hos mössen. För positiva referenskemikalier ska den högsta dosen vara minst lika hög som LLNA EC3-värdena för motsvarande referenskemikalier (se tabell 1) utan att det uppstår systemisk toxicitet och/eller särskilt kraftig hudirritation hos mössen.
- Varje försök ska omfatta en parallell vehikelkontrollgrupp och, där det är lämpligt, en parallell positiv kontrollgrupp.
- Varje dosgrupp ska omfatta minst fyra djur.
- Insamlingen av data kan ske på individuell eller poolad grund.

Om något av dessa kriterier inte uppfylls kan dessa prestandastandarder inte användas för validering av en liknande eller modifierad metod.

II. Minimiförteckning över referenskemikalier

6. I de harmoniserade prestandastandarderna US-ICCVAM, EC-ECVAM och JaCVAM (12) anges 18 referenskemikalier som minst måste användas och 4 alternativa referenskemikalier (dvs. ämnen som ger antingen falska positiva eller falska negativa resultat i LLNA, jämfört med resultat från människor och marsvin [B.6 eller OECD:s testriktlinje 406] (13) och som därför ger möjlighet att påvisa samma eller bättre prestanda än LLNA) som ingår i prestandastandarderna för LLNA. För kemikalierna användes följande urvalskriterier:

- Förteckningen över referenskemikalier representerar de typer av ämnen som typiskt testas för sin hudsensibiliseringspotential och den responsskala som kan mätas eller förutses med LLNA.
- Ämnena har en väldefinierad kemisk struktur.
- LLNA-data från test på marsvin (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406) (13) och (där det är möjligt) data från människor finns att tillgå för varje ämne.
- Ämnena kan enkelt införskaffas på marknaden.

De rekommenderade referenskemikalierna förtecknas i tabell 1. När de föreslagna referenskemikalierna används i ett försök ska de utvärderas i den vehikel som de förtecknas med i tabell 1. I situationer där ett förtecknat ämne inte finns att tillgå kan man använda andra ämnen som uppfyller urvalskriterierna, förutsatt att tillbörlig motivering kan ges.

Tabell 1

Rekommenderade referenskemikalier för prestandastandarder för LLNA

Nummer	Kemikalie ⁽¹⁾	CAS-nummer	Form	Veh ⁽²⁾	EC3 % ⁽³⁾	N ⁽⁴⁾	0,5x – 2,0x EC3	Faktisk EC3-ska- la	LLNA vs GP	LLNA vs människa
1	5-klor-2-metyl-4-isotiazolin-3-on (CMI)/2-metyl-4-isotiazolin-3-on (MI) ⁽⁵⁾	26172-55-4/2682-20-4	Vätska	DMF	0,009	1	0,0045–0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Fast	AOO	0,049	15	0,025–0,099	0,02–0,094	+/+	+/+
3	4-fenylendiamin	106-50-3	Fast	AOO	0,11	6	0,055–0,22	0,07–0,16	+/+	+/+
4	Koboltklorid	7646-79-9	Fast	DMSO	0,6	2	0,3–1,2	0,4–0,8	+/+	+/+
5	Isoeugenol	97-54-1	Vätska	AOO	1,5	47	0,77–3,1	0,5–3,3	+/+	+/+
6	2-mercaptobensotiazol	149-30-4	Fast	DMF	1,7	1	0,85–3,4	NC	+/+	+/+
7	Citral	5392-40-5	Vätska	AOO	9,2	6	4,6–18,3	5,1–13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Vätska	AOO	9,7	21	4,8–19,5	4,4–14,7	+/+	+/+
9	Eugenol	97-53-0	Vätska	AOO	10,1	11	5,05–20,2	4,9–15	+/+	+/+
10	Fenylbensoat	93-99-2	Fast	AOO	13,6	3	6,8–27,2	1,2–20	+/+	+/+
11	Kanelalkohol	104-54-1	Fast	AOO	21	1	10,5–42	NC	+/+	+/+
12	Imidazolidinylurea	39236-46-9	Fast	DMF	24	1	12–48	NC	+/+	+/+
13	Metylmetakrylat	80-62-6	Vätska	AOO	90	1	45–100	NC	+/+	+/+
14	Klorbensen	108-90-7	Vätska	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15	Isopropanol	67-63-0	Vätska	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+
16	Mjölksyra	50-21-5	Vätska	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	Metylsalicylat	119-36-8	Vätska	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	Salicylsyra	69-72-7	Fast	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–

Nummer	Kemikalie ⁽¹⁾	CAS-nummer	Form	Veh ⁽²⁾	EC3 % ⁽³⁾	N ⁽⁴⁾	0,5x – 2,0x EC3	Faktisk EC3-ska- la	LLNA vs GP	LLNA vs människa
Alternativa ämnen för att påvisa bättre prestanda jämfört med LLNA										
19	Natriumlaurylsulfat	151-21-3	Fast	DMF	8,1	5	4,05–16,2	1,5–17,1	+/-	+/-
20	Etylenglykoldimetakrylat	97-90-5	Vätska	MEK	28	1	14–56	NC	+/-	+/+
21	Xylen	1330-20-7	Vätska	AOO	95,8	1	47,9–100	NC	+/ ^(**)	+/-
22	Nickelklorid	7718-54-9	Vätska	DMSO	5	2	NA	NA	-/+	-/+

Förkortningar: AOO = aceton:olivolja (4:1, volym/volym), CAS-nummer = Chemical Abstracts Service-nummer, DMF = N,N-dimetylformamid, DMSO = dimetylsulfoxid, DNCB = 2,4-dinitroklorbensen, EC3 = uppskattad koncentration som krävs för att få stimulationsindex 3, Fast = fast ämne, GP = testresultat från marsvin (dvs. B.6 eller OECD:s testriktlinje 406) (13), HCA = hexylkanelaldehyd, LLNA = resultat från murint lokalt lymfnodtest (dvs. B.42 eller OECD:s testriktlinje 429) (1), MEK = metyletylketon, NA = inte tillämpligt eftersom stimulationsindex < 3, NC = ej beräknat eftersom data erhöles från ett enskilt försök, Veh = testvehikel, Vätska = ämne i vätskeform.

(*) Antas inte vara sensibiliserande för människor eftersom inga resultat från kliniska lapptest kunde fås fram, ämnet ingår inte som en allergen i lapptest och inga rapporter om sensibilisering hos människa kunde fås fram.

(**) GP-data finns inte att tillgå.

⁽¹⁾ Kemikalierna ska beredas dagligen utom om stabilitetsdata visar att lagring kan accepteras.

⁽²⁾ Eftersom olika vehiklar potentiellt kan påverka LLNA-testprestanda bör endast den rekommenderade vehikeln för respektive referenskemikalie användas (24) (32).

⁽³⁾ Medelvärde i fall där flera EC3-värden fanns att tillgå. För negativa ämnen (dvs. med stimulationsindex < 3) anges den högsta testade koncentrationen.

⁽⁴⁾ Antalet LLNA-försök från vilka data erhöles.

⁽⁵⁾ Kommersiellt tillgängligt som Kathon CG (CAS-nummer 55965-84-9), som är en 3:1-blandning av CMI and MI. De relativa koncentrationerna för varje komponent varierar från 1,1 % till 1,25 % (CMI) och 0,3 % till 0,45 % (MI). De inaktiva komponenterna är magnesiumsalter (21,5 % till 24 %) och kopparnitrat (0,15 % till 0,17 %), och den återstående formuleringen är 74–77 % vatten. Kathon CG fås från Sigma-Aldrich och Rohm and Haas (numera Dow Chemical Corporation).

III. Definierad tillförlitlighet och standarder för exakthet

7. Exaktheten hos en liknande eller modifierad LLNA-metod ska vara samma som eller högre än för prestandastandarderna för LLNA när utvärderingen görs med det minsta tillåtna antalet (18) referenskemikalier. Den nya eller modifierade metoden bör ge korrekt klassificering enligt en ja-/nej-beslutsväg. Det kan dock hända att den nya eller modifierade metoden inte ger korrekt klassificering av alla de kemikalier som minst måste användas. Om t.ex. ett av de svaga sensibiliserande ämnena klassificeras fel, kan en motivering för felklassificeringen och lämpliga tilläggsuppgifter (t.ex. testresultat som ger korrekt klassificering för andra ämnen med liknande fysikaliska, kemiska och sensibiliserande egenskaper) anses påvisa likvärdiga prestanda. Under sådana omständigheter utvärderas valideringsstatus för den nya eller modifierade LLNA-testmetoden från fall till fall.

Reproducerbarhet inom laboratoriet

8. För bestämning av reproducerbarheten inom ett laboratorium ska en ny eller modifierad LLNA-metod utvärderas med ett sensibiliserande ämne som är väl karakteriserat i LLNA. Prestandastandarderna för LLNA grundar sig därför på hur resultaten varierar mellan upprepade testningar av hexylkanelaldehyd. För bedömning av tillförlitligheten inom laboratoriet bör värden för uppskattad koncentrationströskel (EC_t) för hexylkanelaldehyd härledas vid fyra separata tillfällen med minst en vecka mellan testningarna. Reproducerbarheten inom laboratoriet anses vara godtagbar om varje hexylkanelaldehydtest ger EC_t-värden mellan 5 % och 20 %, vilket representerar skalan 0,5–2,0 gånger det medelvärde för EC₃ som specificeras för hexylkanelaldehyd (10 %) i LLNA (se tabell 1).

Reproducerbarhet mellan laboratorier

9. För bestämning av reproducerbarheten mellan laboratorier bör en ny eller modifierad LLNA-metod utvärderas med två sensibiliserande ämnen som är väl karakteriserade i LLNA. Prestandastandarderna för LLNA grundar sig på variationerna i resultat från testning av hexylkanelaldehyd och 2,4-dinitroklorbensen (DNCB) i olika laboratorier. EC_t-värdena bör tas fram genom enskilda fristående försök i minst tre separata laboratorier. Reproducerbarheten mellan laboratorier anses vara godtagbar om varje laboratorium får EC_t-värden som är 5–20 % för hexylkanelaldehyd och 0,025–0,1 % för 2,4-dinitroklorbensen, vilket representerar skalan 0,5–2,0 gånger det EC₃-medelvärde som specificeras för hexylkanelaldehyd (10 %) och 2,4-dinitroklorbensen (0,05 %) i LLNA (se tabell 1).

Tillägg 2

Definitioner

Exakthet: Mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Exakthet är ett mått på testmetodens prestanda och en relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med 'konkordans' för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (14).

Referensämne: Sensibiliserande eller icke-sensibiliserande ämne som används som standard för jämförelse med ett testämne. Ett referensämne ska ha följande egenskaper: i) En eller flera enhetliga och tillförlitliga källor. ii) Strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas. iii) Kända fysikalisk-kemiska egenskaper. iv) Stödande data om kända effekter. v) Känd styrka inom det avsedda responsområdet.

Uppskattad koncentrationströskel (EC_t): Uppskattad testämneskoncentration som krävs för att ge ett stimulationsindex som tyder på positiv respons.

Uppskattad koncentration tre (EC₃): Uppskattad testämneskoncentration som krävs för att ge värdet tre för stimulationsindex.

Falskt negativt: Ett testämne som felaktigt har identifierats som negativt eller icke-aktivt genom en testmetod trots att ämnet i själva verket är positivt eller aktivt.

Falskt positivt: Ett testämne som felaktigt har identifierats som positivt eller aktivt genom en testmetod trots att ämnet i själva verket är negativt eller icke-aktivt.

Fara: Potentialen för skadliga verkningar på hälsa eller miljö. De skadliga verkningarna visar sig enbart om exponeringsnivån är tillräcklig.

Reproducerbarhet mellan laboratorier: Ett mått på i hur stor utsträckning olika kvalificerade laboratorier kan producera kvalitativt och kvantitativt liknande resultat, med användning av samma protokoll och samma testämnen. Reproducerbarheten mellan laboratorier fastställs under förvalideringen och valideringen och den indikerar i hur stor utsträckning ett test framgångsrikt kan överföras mellan laboratorier (14).

Reproducerbarhet inom laboratoriet: Ett mått på i vilken utsträckning kvalificerade personer inom samma laboratorium framgångsrikt kan upprepa resultat vid olika tidpunkter när de använder ett visst protokoll.

Me too-test: Ett vardagligt uttryck för en testmetod som strukturellt och funktionellt liknar en validerad och godtagen referenstestmetod. En sådan testmetod kan vara en kandidat för jämförande validering. Kallas även 'liknande testmetod' (14).

Utanförliggande värde: Ett utanförliggande värde ('outlier') är en observation som markant skiljer sig från de övriga värdena i ett slumpmässigt urval från en population.

Prestandastandarder (PS): Standarder som baseras på en validerad testmetod och som utgör grunden för utvärdering av jämförbarheten för en föreslagen testmetod som är funktionellt och mekaniskt likartad. Dessa standarder omfattar i) testmetodens grundläggande komponenter, ii) en minimiförteckning med referenskemikalier som valts ut från de kemikalier som använts för att påvisa att den validerade testmetoden fungerar tillfredsställande och iii) de liknande nivåer av exakthet och tillförlitlighet, på grundval av vad som erhållits för den validerade testmetoden, som den föreslagna testmetoden bör påvisa när den utvärderas med användning av minimiförteckningen med referenskemikalier (14).

Äganderättsligt skyddad testmetod: En testmetod vars tillverkning och distribution begränsas genom patent, upphovsrätter, varumärken och dylikt.

Kvalitetssäkring: En styrningsprocess där personer som är i oberoende ställning i förhållande till de personer som genomför testningen bedömer hur standarder, krav och registreringsförfaranden för laboratorietestning följs och hur exakt data förmedlas.

Referenskemikalier: Kemikalier som valts för användning i valideringsprocessen och för vilka responsen i *in vitro*- eller *in vivo*-referenstestsystem eller på de berörda arterna är känd. Kemikalierna bör vara representativa för de kemikalieklasser som testmetoden är avsedd för och bör representera hela skalan av respons som kan förväntas för de kemikalier som testas med metoden, från stark till svag till negativ. Det kan krävas olika uppsättningar referenskemikalier för valideringsprocessens olika skeden och för olika testmetoder och testanvändningar (14).

Relevans: Beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida detta förhållande är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur väl man genom testet korrekt kan mäta och förutse den biologiska effekt det gäller. Relevans omfattar också överväganden om en testmetods exakthet (konkordans) (14).

Tillförlitlighet: Ett mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när metoden utförs med samma protokoll. Den bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier (14).

Hudsensibilisering: En immunologisk process som följer av att en mottaglig individ exponeras ytvägen för en inducerande kemisk allergen som provocerar en kutan immunrespons som kan leda till att det uppstår kontaktsensibilisering.

Stimulationsindex (SI): Ett värde som beräknas för att bedöma hudsensibiliseringspotentialen hos ett testämne och som är förhållandet mellan proliferationen i behandlingsgrupperna och proliferationen i den parallella vehikelkontrollgruppen.

Testämne (kallas också testkemikalie): Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

Validerad testmetod: En testmetod för vilken valideringsstudier har genomförts för att fastställa relevans (inbegripet exakthet) och tillförlitlighet för ett specifikt ändamål. Det är viktigt att notera att en validerad testmetod kanske inte är tillräckligt exakt och tillförlitlig när det gäller ett visst föreslaget ändamål (14)."

2. Kapitel B.46 ska ersättas med följande:

"B.46. IN VITRO-HUDIRRITATION: TESTMETOD MED REKONSTRUERAD HUMAN HUD

INLEDNING

1. Hudirritation betyder att det uppstår reversibel skada på huden efter applicering av en testkemikalie i upp till fyra timmar, enligt definitionen i Förenta nationernas globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (FN:s GHS) och Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP-förordningen) (1) (3). Denna testmetod innebär ett *in vitro*-förfarande som kan användas för identifiering av faror med irriterande kemikalier (ämnen och blandningar) enligt FN:s GHS och EU:s CLP-kategori 2 (1) (2) (3). I EU och andra regioner som inte har antagit FN:s frivilliga GHS-kategori 3 (svagt irriterande ämnen) kan testmetoden även användas för att identifiera icke-klassificerade kemikalier, dvs. 'ingen kategori' enligt FN:s GHS och CLP-förordningen (1) (3). Testmetoden kan användas för att fastställa kemikaliers hudirriterande verkan som ett fristående ersättningstest för *in vivo*-testning för hudirritation som en del av en strategi för stegvis testning (4 och kapitel B.4 i denna bilaga).

2. Bedömningen av hudirritation har vanligtvis inneburit användning av laboratoriedjur (OECD:s testriktlinje 404, kapitel B.4 i denna bilaga) (4). På grund av frågor rörande djurens välbefinnande reviderades metod B.4 år 2004 och med den kan man fastställa hudkorrosion/hudirritation genom att tillämpa en stegvis teststrategi med validerade *in vitro*- och *ex vivo*-metoder, och på så sätt undvika smärta och lidande hos djur. Tre validerade *in vitro*-testmetoder har antagits som OECD:s testriktlinjer 430, 431 och 435 (5) (6) (7) och två av dem som kapitel B.40 och B.40a i denna bilaga, för att användas för korrosivitetsdelen i den stegvisa teststrategin i B.4 eller OECD:s testriktlinje 404 (4).
3. Denna testmetod gäller hudirritation som en slutpunkt för människa. Den baserar sig på rekonstruerad human hud (RhE) där produkten (användning av icke-transformerade keratinocyter i epidermis med humant ursprung som cellkälla och användning av representativ vävnad och cytoarkitektur) har mycket liknande biokemiska och fysiologiska egenskaper som den humana överhuden (epidermis). Denna testmetod omfattar också en uppsättning prestandastandarder (tillägg 2) för bedömning av liknande och modifierade RhE-baserade metoder som utvecklats av EC-ECVAM (8), i enlighet med principerna i OECD:s riktlinjedokument nr 34 (9).
4. Det finns tre validerade metoder som följer denna testmetod. Förvalidering, optimering och valideringsstudier har genomförts för en *in vitro*-metod (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) med användning av en RhE-modell som finns kommersiellt tillgänglig som EpiSkinTM (utsedd till validerad referensmetod). Två andra kommersiellt tillgängliga *in vitro*-hudirritationsmetoder enligt RhE-modellen har enligt prestandastandardbaserad validering visat liknande resultat som den validerade referensmetoden (21) – metoderna är EpiDermTM SIT (EPI-200) och SkinEthicTM RHE (22).
5. Innan en föreslagen liknande eller modifierad *in vitro*-metod enligt RhE-modell annan än den validerade referensmetoden, EpiDermTM SIT (EPI-200) eller SkinEthicTM RHE, kan användas för lagenliga ändamål bör metodens tillförlitlighet, relevans (exakthet) och begränsningar för den föreslagna användningen bestämmas för att säkerställa att metoden kan anses vara liknande den validerade referensmetoden, i enlighet med kraven i prestandastandarder som anges i denna testmetod (tillägg 2). Det är också rekommendabelt att studera OECD:s bakgrundsdokument rörande *in vitro*-hudirritationstestning innan man utvecklar och validerar en liknande eller modifierad *in vitro*-metod enligt RhE-modell och lämnar in den för godkännande (23).

DEFINITIONER

6. Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

7. En begränsning av testmetoden, såsom det påvisas i valideringsstudien (16), är att man inte kan klassificera kemikalier för FN:s frivilliga GHS-kategori 3 (svagt irriterande ämnen) (1). När metoden används som ett partiellt ersättningstest kan det krävas uppföljande *in vivo*-testning för att få en fullständig bild av hudirritationspotentialen (4 och kapitel B.4 i denna bilaga). Användningen av human hud är föremål för nationella och internationella etiska överväganden och begränsningar.
8. Denna testmetod hänför sig till *in vitro*-hudirritationskomponenten i den stegvisa testningsstrategin för B.4 (OECD:s testriktlinje 404) om hudkorrosion/hudirritation (4). Den ger inte tillräcklig information om hudkorrosion, men här bör noteras att B.40a (OECD:s testriktlinje 431) om hudkorrosion baserar sig på samma RhE-testsystem, om än med användning av ett annat protokoll (kapitel B.40a). Denna metod baserar sig på RhE-modeller med användning av humana keratinocyter, som därför representerar *in vitro*-målorganet hos den art det gäller. Metoden täcker dessutom direkt det inledande steget hos den inflammatoriska kaskaden/funktionsmekanismen (cellskada och vävnadsskada som leder till lokaliserat trauma) som inträffar vid irritation *in vivo*. En omfattande mängd olika kemikalier har testats vid den validering som ligger till grund för denna testmetod och valideringsstudiens empiriska databas uppgick till totalt 58 kemikalier (16) (18) (23). Tillämpligheten omfattar fasta ämnen, vätskor, halvfasta ämnen och vaxer. Vätskorna kan vara vattenbaserade eller icke-vattenbaserade och de fasta ämnena kan vara vattenlösliga eller icke-vattenlösliga. Fasta ämnen ska alltid när det är möjligt malas ned till fint pulver före appliceringen, och ingen annan beredning behövs. Gaser och aerosoler har ännu inte bedömts genom valideringsstudier (24). Det är tänkbart att de kan testas med RhE-teknik, men den aktuella testmetoden ger inte möjlighet att testa gaser och aerosoler. Det bör också noteras att mycket färgstarka kemikalier kan störa cellviabilitetsmätningarna och för dem krävs användning av anpassade kontrollgrupper för korrigering (se punkterna 24–26).
9. En enda testomgång med tre vävnadsbitar bör vara tillräcklig för en testkemikalie förutsatt att klassificeringen är otvetydig. I fall av gränsresultat, såsom icke-konkordanta mätningar av vävnadsbitarna och/eller genomsnittlig procentuell viabilitet lika med $50 \pm 5\%$, bör man överväga en andra testomgång, och en tredje omgång om resultaten mellan de två första omgångarna är diskordanta.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

10. Testkemikalien appliceras lokalt på en tredimensionell RhE-modell som består av icke-transformerade epidermala keratinocyter av humant ursprung som har odlats till att bilda en starkt differentierad modell av human hud i flera lager. Den består av ordnade lager: basalt lager, taggcellslager och granulärt lager samt ett hornlager i flera skikt som innehåller intercellulära lamellager som representerar de huvudsakliga lipidklasser som motsvarar dem som förekommer *in vivo*.

11. Kemiskt inducerad hudirritation, som manifesterar sig som hudrodnad och ödem, är resultatet av en rad händelser som börjar med penetration av hornlagret (*stratum corneum*) och skador på de underliggande lagren av keratinocyter. De döende keratinocyterna avger mediatorer som inleder den inflammatoriska kaskaden som påverkar cellerna i huden, särskilt stroma- och endotelceller. Utvidgningen och den ökade permeabiliteten hos endotelcellerna ger upphov till den observerade hudrodnaden och det observerade ödemet (24). Den RhE-baserade metoden mäter kaskadens initierande händelser.
12. I RhE-modeller mäts cellviabiliteten genom enzymatisk omvandling av det vitala färgämnet MTT [(3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid, tiazolylblått, CAS-nummer 298-93-1)], till ett blått formazansalt som mäts kvantitativt efter det att vävnaderna har extraherats (25). Irriterande kemikalier identifieras genom deras förmåga att minska cellviabiliteten under definierade gränsvärden (dvs. $\leq 50\%$ för kategori 2 enligt FN:s GHS och CLP-förordningen). Beroende på den rättsliga ram inom vilken resultaten från denna testmetod används, kan kemikalier som ger cellviabilitet ovanför den definierade tröskelnivån anses vara icke-irriterande (dvs. $> 50\%$, ingen kategori).

KVALITETSDEMONSTRATION

13. Före rutinanvändning av någon av de tre validerade testmetoderna enligt denna testmetod bör laboratorierna påvisa sin tekniska kvalitet med användning av de tio referenskemikalier som förtecknas i tabell 1. För liknande metoder som utvecklas enligt denna testmetod eller för modifikationer av någon av de tre validerade metoderna bör de prestandastandardkrav som beskrivs i tillägg 2 till denna testmetod uppfyllas innan metoden används för lagstadgad testning.
14. Som en del av kvalitetsförfarandet rekommenderas att användarna efter mottagande av vävnaden verifierar dess barriäregenskaper enligt specifikationerna från RhE-modelltillverkaren. Detta är särskilt viktigt om vävnader transporteras över långa sträckor eller om transporten tar lång tid. När en metod har etablerats på ett framgångsrikt sätt och kvaliteten hos metodanvändningen har påvisats, behöver sådana verifikationer inte göras rutinmässigt. När en metod används rutinmässigt rekommenderas dock att bedömningen av barriäregenskaperna görs med jämna mellanrum.

Tabell 1

Referenskemikalier ⁽¹⁾

Kemikalie	CAS-nummer	In vivo -gradering ⁽²⁾	Fysikaliskt tillstånd	Kategori enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen
naftalenänttisyra	86-87-3	0	Fast ämne	Ingen kat.
isopropanol	67-63-0	0,3	Vätska	Ingen kat.
metylstearat	112-61-8	1	Fast ämne	Ingen kat.
heptylbutyrat	5870-93-9	1,7	Vätska	Ingen kat. (Valfri kat. 3) ⁽³⁾ ⁽⁴⁾
hexylsalicylat	6259-76-3	2	Vätska	Ingen kat. (Valfri kat. 3) ⁽³⁾ ⁽⁴⁾
cyklamenaldehyd	103-95-7	2,3	Vätska	Kat. 2
1-bromhexan	111-25-1	2,7	Vätska	Kat. 2
kaliumhydroxid (5 % vattenlösning)	1310-58-3	3	Vätska	Kat. 2
1-metyl-3-fenyl-1-piperazin	5271-27-2	3,3	Fast ämne	Kat. 2
heptanal	111-71-7	3,4	Vätska	Kat. 2

⁽¹⁾ Dessa referenskemikalier är en underuppsättning av de referenskemikalier som användes i valideringsstudien.

⁽²⁾ In vivo-gradering enligt B.4 och OECD:s testriktlinje 404 (4).

⁽³⁾ I denna testmetod betraktas FN:s valfria GHS-kategori 3 (svagt irriterande ämnen) (1) som 'ingen kategori'.

⁽⁴⁾ FN:s valfria GHS-kategori 3 är inte tillämplig enligt CLP-förordningen.

FÖRFARANDE

15. Nedan följer en beskrivning av komponenterna och förfarandena för en RhE-metod för bedömning av hudirritation. En RhE-modell bör rekonstrueras, och den kan beredas i laboratoriet eller anskaffas på kommersiell väg. Det finns operativa standardförfaranden för EpiSkinTM, EpiDermTM SIT (EPI-200) och SkinEthicTM RhE att tillgå (26) (27) (28). Testningen ska genomföras enligt nedan angivna beskrivning.

RhE-testmetod, komponenter*Allmänna betingelser*

16. Icke-transformerade humana keratinocyter ska användas för rekonstruktion av epitelvävnaden. Flera lager av viabla epitelceller (basala lager, taggcellslager och granulära lager) ska finnas under ett funktionellt hornlager. Hornlagret ska bestå av flera skikt och innehålla den väsentliga lipidprofilen för att ge en funktionell barriär som är tillräckligt robust för att stå emot snabb penetrering av cytotoxiska markörer (t.ex. natriumdodekylsulfat eller Triton X-100). Barriärfunktionen bör påvisas och kan bedömas antingen genom bestämning av den koncentration vid vilken markören minskar vävnadernas viabilitet med 50 % (IC₅₀) efter en fast exponeringstid eller genom att bestämma den exponeringstid som krävs för att minska cellviabiliteten med 50 % (ET₅₀) vid applicering av en viss fastställd koncentration av markören. RhE-modellens inneslutningsegenskaper ska förhindra att material kan passera runt hornlagret till den viabla vävnaden, vilket kan leda till en bristande modellering av hudexponeringen. RhE-modellen får inte vara förorenad med bakterier, virus, mykoplasma eller svamp.

*Funktionella betingelser**Viabilitet*

17. För bestämning av viabiliteten används MTT-test (25). Användare av RhE-modellen bör se till att varje sats uppfyller de definierade kriterierna för negativ kontroll. Extraktionsmedlets optiska densitet (OD) bör vara tillräcklig låg, dvs. under 0,1. Godkända värden (inom en övre och en undre gräns) för den negativa kontrollens OD-värden (i betingelserna för testmetoden för hudirritation) fastställs av RhE-modellens utvecklare/leverantör, och godkända värden för de tre validerade metoderna anges i tabell 2. Det bör finnas dokumenterat att de vävnader som behandlas med den negativa kontrollen är stabila i odlingar (ger motsvarande resultat vid viabilitetsmätning) under testets hela exponeringsperiod.

Tabell 2

Godkända OD-värden för den negativa kontrollen

	Nedre gräns för godkännande	Övre gräns för godkännande
EpiSkin TM (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm TM SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic TM RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Barriärfunktion

18. Hornlagret och dess lipida sammansättning ska vara tillräcklig för att stå emot snabb penetrering av cytotoxiska markörkemikalier, t.ex. SDS eller Triton X-100, enligt uppskattningar genom IC₅₀ eller ET₅₀ (tabell 3).

Morfologi

19. Histologisk undersökning av RhE-modellen bör göras för att påvisa att strukturen motsvarar human hud (inklusive flerskiktat hornlager).

Reproducerbarhet

20. Resultaten av testning med positiv kontrollkemikalie och negativ kontroll bör påvisa reproducerbarhet över tiden.

Kvalitetskontroll

21. Utvecklaren/leverantören av RhE-modellen bör säkerställa och påvisa att varje sats RhE-modell som används uppfyller de fastställda produktkriterierna, där kriterierna för *viabilitet* (punkt 17), *barriärfunktion* (punkt 18) och *morfologi* (punkt 19) är de viktigaste. Dessa data bör ges till metodanvändarna så att de kan införliva informationen i testrapporten. Godkända värden (inom en övre och en undre gräns) för IC₅₀ eller ET₅₀ ska fastställas av utvecklaren/leverantören av RhE-modellen (eller en forskare om en intern modell används). Endast resultat som har producerats med kvalificerade vävnader kan godkännas för tillförlitlig beräkning av irritationsklassificering. Som exempel visas godkända värden för de tre validerade metoderna i tabell 3.

Tabell 3

Exempel på kriterier för kvalitetskontroll för leverans av en sats

	Nedre gräns för godkännande	Övre gräns för godkännande
EpiSkin™ (SM) (18 timmars behandling med SDS) (26)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (27)	ET ₅₀ = 4,8 timmar	ET ₅₀ = 8,7 timmar
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (28)	ET ₅₀ = 4,0 timmar	ET ₅₀ = 9,0 timmar

Applisering av test- och kontrollkemikalier

22. Minst tre vävnadsbitar ska användas per testkemikalie och för kontrollerna i varje omgång. För vätskor och fasta ämnen appliceras en tillräcklig mängd av testkemikalien så att hudens yta täcks med ett jämnt lager så att en infinit dos undviks. Dosen ska vara minst 25 µl/cm² eller 25 mg/cm². För fasta ämnen fuktas hudens yta med avjoniserat eller destillerat vatten före appliceringen för att förbättra kontakten mellan testkemikalien och hudens yta. När det är möjligt ska fasta ämnen testas i form av ett fint pulver. Vid slutet av exponeringsperioden tvättas testämnet omsorgsfullt bort från hudens yta med buffrad vattenlösning eller 0,9-procentig NaCl. Beroende på vilken av de tre validerade RhE-metoderna som används varierar exponeringsperioden mellan 15 och 60 minuter och inkubationstemperaturen mellan 20 och 37 °C. Dessa exponeringsperioder och temperaturer optimeras för varje RhE-metod och beror på metodernas olika karaktär. Närmare beskrivning finns i de operativa standardförfarandena för metoderna (26) (27) (28).
23. Negativa kontroller (NC) och positiva kontroller (PC) ska användas parallellt vid varje testomgång för att visa att viabiliteten (med NC), barriärfunktionen och den resulterande känsligheten (med PC) hos vävnaderna ligger inom fastställda godkända historiska värden. För den positiva kontrollen föreslås 5-procentig vattenlösning av natriumdodekylsulfat. För den negativa kontrollen föreslås vatten eller fosfatbuffrad saltlösning.

Mätning av cellernas viabilitet

24. Den viktigaste faktorn i testningsförfarandet är att viabilitetsmätningarna inte utförs omedelbart efter exponeringen för testkemikalien, utan först efter att de sköljda vävnaderna har haft en tillräckligt lång inkubationstid i färskt medium efter behandlingen. Under denna period kan vävnaderna antingen återhämta sig från svagt irriterande effekter eller utveckla tydliga cytotoxiska effekter. Vid testoptimeringsfasen (11) (12) (13) (14) (15) påvisades att en inkubationstid på 42 timmar efter behandlingen är optimal.
25. MTT-metoden är en validerad kvantitativ metod som ska användas i denna testmetod för att mäta cellviabiliteten. Den kan användas på en tredimensionell vävnadsmodell. Vävnadsprovet placeras i en MTT-lösning av lämplig koncentration (t.ex. 0,3–1 mg/ml) i 3 timmar. Den kondenserade blå formazanprodukten extraheras sedan från vävnaden med ett lösningsmedel (t.ex. isopropanol, sur isopropanol) och koncentrationen av formazan mäts genom bestämning av OD vid 570 nm med ett filterbandpass på högst ± 30 nm.
26. Testkemikalien optiska egenskaper eller kemiska verkan på MTT kan störa bestämningen, vilket leder till en felaktig uppskattning av viabiliteten (testkemikalien kan förhindra eller vända färgutvecklingen, men kan även vara orsaken till den). Detta kan ske när en specifik testkemikalie inte avlägsnas fullständigt från vävnaden genom sköljning eller när den penetrerar överhuden. Om testkemikalien reagerar direkt på MTT (dvs. MTT-reduktion sker), är naturfärgad eller färgas under behandlingen av vävnaden, bör ytterligare kontroller göras så att man kan upptäcka och korrigera för testkemikalien störande inverkan på tekniken för mätning av viabiliteten. Detaljerad beskrivning hur direkt MTT-reduktion och störningar av färgämnen kan korrigeras finns i de operativa standardförfarandena för de tre validerade metoderna (26) (27) (28).

Kriterier för godkännande

27. För varje metod där giltiga RhE-modellsatser används (se punkt 21) ska de vävnader som behandlats med negativ kontroll visa ett OD-värde som avspeglar kvaliteten på vävnader som har följt alla transport- och mottagningsförfaranden och alla protokollprocesser. Kontrollernas OD-värden bör inte ligga under de historiskt fastställda gränserna. Likaså bör vävnader som behandlats med den positiva kontrollkemikalien (5-procentig vattenlösning av natriumdodekylsulfat) avspegla deras förmåga att ge respons på en irritationsframkallade kemikalie i testmetodens betingelser (26) (27) (28). Lämpliga mått för variationerna mellan vävnadsbitarna bör fastställas (om t.ex. standardavvikelser används bör de ligga inom det ensidiga toleransintervall på 95 % som beräknats enligt historiska data, och för den validerade referensmetoden bör standardavvikelsen ligga under 18 %).

Tolkning av resultaten och förutsägbarhetsmodell

28. De OD-värden som erhålls för varje testkemikalie kan användas för att beräkna procentuell viabilitet jämfört med den negativa kontrollen, som fastställs till 100 %. Det procentuella viabilitetsgränsvärdet skiljer irriterande testkemikalier från icke-klassificerade testkemikalier, och det eller de statistiska förfarande(n) som används för att utvärdera resultaten och identifiera irriterande ämnen ska vara klart definierade och dokumenterade och ska vara bevisat lämpliga. Gränsvärdena för förutsägelse av irritation anges nedan.

- Testkemikalien anses vara irriterande för huden enligt kategori 2 i FN:s GHS eller CLP-förordningen om vävnadsviabiliteten efter exponering och efterföljande inkubation är mindre än eller lika med ($\leq$) 50 %.
- Beroende på den rättsliga ram inom vilken resultaten från denna testmetod används, kan testkemikalien anses vara icke-irriterande för huden enligt 'ingen kategori' enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen om vävnadsviabiliteten efter exponeringen och efterföljande inkubation är mer än ($>$) 50 %.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

29. För varje omgång ska data från enskilda vävnadsbitar (t.ex. OD-värden och data om beräknad procentuell cellviabilitet för varje testkemikalie, inklusive klassificering) rapporteras i tabellform, i tillämpliga fall även data från upprepade försök. Dessutom ska medelvärden $\pm$ standardavvikelser för varje omgång rapporteras. Observerade interaktioner med MTT-reagenser och färgade testkemikalier ska rapporteras för varje testad kemikalie.

Testrapport

30. Testrapporten ska innehålla följande information:

Test- och kontrollkemikalier:

- Kemikaliens namn – CAS-namn och -nummer, EG-namn och -nummer, om kända.
- Kemikaliens renhet och sammansättning (i procent per vikt).
- Fysikaliska/kemiska egenskaper som är relevanta för utförandet av undersökningen (t.ex. fysiskt tillstånd, stabilitet och flyktighet, pH-värde och vattenlöslighet, om kända).
- Behandling av test- och kontrollämnen före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).
- Lagringsförhållanden.

Motivering för den RhE-modell och det protokoll som använts.

Testbetingelser:

- Cellsystem.
- Fullständig stödande information för den specifika RhE-modell som använts, inklusive modellens prestanda. Informationen ska omfatta men inte vara begränsad till följande:
 - i) Viabilitet.
 - ii) Barriärfunktion.
 - iii) Morfologi.
 - iv) Reproducerbarhet och förutsägbarhet.
 - v) Kvalitetskontroller av modellen.
- Detaljerade uppgifter om försöksförfarandet.
- Använda testdoser, exponeringens varaktighet och inkubationstid efter behandlingen.
- Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet.

- Hänvisning till historiska uppgifter om modellen. Dessa ska omfatta men inte vara begränsade till följande:
 - i) Uppgifter om huruvida kvalitetskontrolldata är godtagbara med avseende på historiska uppgifter om respektive använd sats.
 - ii) Uppgifter om huruvida de positiva och negativa kontrollvärdena är godtagbara med avseende på positiva och negativa medelvärden och värdeområden.
- Beskrivning av använda utvärderingskriterier, inklusive motivering för valet av förutsägbarhetsmodellens gränsvärde(n).
- Hänvisningar till historiska kontrolldata.

Resultat:

- Data i tabellform för enskilda testkemikalier för varje omgång och varje vävnadsmätning.
- Uppgifter om kontroller som använts för direkt MTT-reduktion och/eller färgade testkemikalier.
- Beskrivning av övriga observerade effekter.

Diskussion om resultaten.

Slutsatser.

HÄNVISNINGAR

- (1) UN (2009), *United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*, Third revised edition, UN New York and Geneva. Finns på: 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. Finns på: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>
- (3) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006 (EUT L 353, 31.12.2008, s. 1).
- (4) OECD (2004), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris. Finns på: <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. Finns på: <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. Finns på: <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. Finns på: <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)? Finns på: <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. Finns på: <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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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 . Finns på: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>
- (18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. och 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-Tessonneaud, E. och 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. Finns på: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>
- (21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Finns på: <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. Finns på: <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. Finns på: http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html
- (24) Welss, T., Basketter, D.A. och 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) EpiSkinTM SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkinTM test method 15 min – 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Finns på: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>
- (27) EpiDermTM SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: *In vitro* EpiDermTM skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Finns på: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>
- (28) SkinEthicTM 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. Finns på: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>
- (29) Harvell, J.D., Lamminstusta, K. och Maibach, H.I. (1995), *Irritant contact dermatitis*, In: *Practical Contact Dermatitis*, sidorna 7–18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.
- (30) Kommissionens direktiv 2001/59/EG av den 6 augusti 2001 om anpassning till tekniska framsteg för tjugotonde gången av rådets direktiv 67/548/EEG om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen (EUT L 225, 21.8.2001, s. 1).
- (31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. och 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. och 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. och 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.

Tillägg 1

Definitioner

Exakthet: Mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Exakthet är ett mått på testmetodens prestanda och en relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med 'konkordans' för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (9).

Cellviabilitet: En parameter för att mäta den totala aktiviteten hos en cellpopulation, t.ex. förmågan hos cellulära mitokondriella dehydrogenaser att reducera det vitala färgämnet MTT (3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid, tiazolylblått). Denna aktivitet korrelerar, beroende på den slutpunkt som uppmäts och den testutformning som används, med det totala antalet levande celler och/eller cellernas vitalitet.

Konkordans: Ett mått på testmetodens prestanda för sådana testmetoder som ger kategoriska resultat, och en aspekt av relevans. Termen används omväxlande med exakthet och definieras som andelen av alla testade kemikalier som klassificeras korrekt som positiva eller negativa (9).

ET₅₀: Uppskattas genom bestämning av den exponeringstid som krävs för att minska cellviabiliteten med 50 % vid applicering av markörkemikalien vid en specificerad, fast koncentration; se även IC₅₀.

CLP-förordningen (Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar): Genom denna förordning genomförs i Europeiska unionen (EU) FN:s GHS-system för klassificering och märkning av kemikalier (ämnen och blandningar) (3).

GHS (det globalt harmoniserade systemet för klassificering och märkning av kemikalier – Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals): Ett system för att klassificera ämnen och blandningar enligt standardiserade typer och nivåer av fysiska risker, hälsorisker och miljörisker och informera om resultaten genom t.ex. piktogram, signalord, faroangivelser, skyddsangivelser och säkerhetsdatablad i syfte att informera om ämnens skadliga effekter för att skydda personer (inklusive arbetsgivare, arbetstagare, transportörer, konsumenter och personal inom räddningstjänsten) och miljön (1).

IC₅₀: Kan uppskattas genom bestämning av den koncentration vid vilken en markörkemikalie minskar vävnadernas viabilitet med 50 % (IC₅₀) efter en fast exponeringstid; se även ET₅₀.

Infinit dos: Den mängd applicerad testkemikalie som överstiger den mängd som krävs för att helt täcka hudens yta med ett jämnt lager.

Me too-test: Ett vardagligt uttryck för en testmetod som strukturellt och funktionellt liknar en validerad och godtagen referenstestmetod. En sådan testmetod kan vara en kandidat för jämförande validering. Kallas även 'liknande testmetod' (9).

Prestandastandarder (PS): Standarder som baseras på en validerad testmetod och som utgör grunden för utvärdering av jämförbarheten för en föreslagen testmetod som är mekaniskt och funktionellt likartad. Dessa standarder omfattar i) testmetodens grundläggande komponenter, ii) en minimiförteckning med referenskemikalier som valts ut från de kemikalier som använts för att påvisa att den validerade metoden fungerar tillfredsställande och iii) de jämförbara nivåer av exakthet och tillförlitlighet, på grundval av vad som erhållits för den validerade testmetoden, som man bör kunna påvisa för den föreslagna testmetoden när den utvärderas med användning av minimiförteckningen med referenskemikalier (9).

Referenskemikalier: Kemikalier som valts för användning i valideringsprocessen och för vilka responsen i *in vitro*- eller *in vivo*-referenstestsystem eller på de berörda arterna är känd. Kemikalierna bör vara representativa för de kemikalieklasser som testmetoden är avsedd för och bör representera hela skalan av respons som kan förväntas för de kemikalier som testas med metoden, från stark till svag till negativ. Det kan krävas olika uppsättningar referenskemikalier för valideringsprocessens olika skeden och för olika testmetoder och testanvändningar (9).

Relevans: Beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida detta förhållande är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur väl man genom testet korrekt kan mäta och förutse den biologiska effekt det gäller. Relevans omfattar också överväganden om en testmetods exakthet (konkordans) (9).

Tillförlitlighet: Ett mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när metoden utförs med samma protokoll. Den bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier (9).

Ersättningstest: Ett test som är utformat att ersätta ett test som används rutinmässigt och som är godkänt för faroidentifiering och/eller riskbedömning och som har konstaterats ge motsvarande eller bättre skydd av människors eller djurs hälsa eller miljön, enligt det som är tillämpligt, jämfört med det godkända testet, för alla tänkbara testningssituationer och kemikalier (9).

Känslighet: Den andel av alla positiva/aktiva testkemikalier som klassificeras korrekt i testet. Begreppet är ett mått på exaktheten hos sådana testmetoder som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av en testmetods relevans (9).

Hudirritation: När en reversibel skada uppstår på huden i upp till fyra timmar efter applicering av en testkemikalie. Hudirritation är en lokal icke-immunogenisk reaktion som uppstår kort efter stimulans (29). Den mest utmärkande egenskapen är den reversibla processen som omfattar inflammatoriska reaktioner och de flesta av de kliniskt karakteristiska tecknen på irritation (hudrodnad, ödem, klåda och smärta) som hör samman med en inflammatorisk process.

Specificitet: Den andel av alla negativa/inaktiva testkemikalier som klassificeras korrekt i testet. Begreppet är ett mått på exaktheten hos sådana testmetoder som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av en testmetods relevans (9).

Stegvis testningsstrategi: Testning där testmetoder används i serie så att de testmetoder som väljs på varje efterföljande nivå bestäms på grundval av föregående testningsnivå (9).

Testkemikalie (kallas också testämne): Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

Tillägg 2

Prestandastandarder för bedömning av föreslagna liknande eller modifierade *in vitro*-metoder med rekonstruerad human hud (RHE) för att testa hudirritation

INLEDNING

1. Syftet med prestandastandarder är att tillhandahålla en grund för att fastställa att nya testmetoder, både äganderättsligt skyddade (dvs. metoder med upphovsrätt, varumärke, registrering) och allmänt tillgängliga metoder är tillräckligt exakta och tillförlitliga för specifika testningsändamål. Dessa prestandastandarder, som grundar sig på validerade och godtagna testmetoder, kan användas för att utvärdera tillförlitligheten och exaktheten hos andra analoga metoder (vardagligt även kallade me too-test) som grundar sig på liknande vetenskapliga principer och som mäter eller förutser samma biologiska eller toxikologiska effekt (9).
2. Innan man antar modifierade metoder (dvs. föreslagna potentiella förbättringar av en godkänd metod) krävs en utvärdering för att fastställa de föreslagna ändringarnas inverkan på testets prestanda och i vilken utsträckning förändringarna påverkar den information som finns att tillgå för de andra komponenterna i valideringsprocessen. Beroende på de föreslagna ändringarnas antal och karaktär, genererade data och stödande dokumentation för ändringarna, bör de antingen vara föremål för samma valideringsprocess som gäller för nya testmetoder eller, där det är lämpligt, för en begränsad bedömning av tillförlitlighet och relevans med användning av etablerade prestandastandarder (9).
3. Liknande (me too-metoder) eller modifierade metoder av någon av de tre validerade metoderna (EpiSkin™ [validerad referensmetod], EpiDerm™ SIT [EPI-200] och SkinEthic™ RHE) som föreslås för användning inom denna testmetod bör utvärderas för tillförlitlighet och exakthet när man använder kemikalier som representerar hela skalan av Draizes irritationspoäng. Vid utvärderingen med användning av de 20 rekommenderade referenskemikalierna enligt prestandastandarden (tabell 1) bör de föreslagna liknande eller modifierade metodernas värden för tillförlitlighet och exakthet vara jämförbara med eller bättre än de värden som fås med den validerade referensmetoden (tabell 2) (2) (16). De värden för tillförlitlighet och exakthet som bör nås anges i punkterna 8–12 i detta tillägg. Kemikalier i kategorin 'inte klassificerad' ('ingen kategori' enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen) och kategorin 'klassificerad' (kategori 2 enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen) (1) som representerar olika kemiska klasser ingår, så att den föreslagna metodens tillförlitlighet och exakthet (känslighet, specificitet och totala exakthet) kan jämföras med motsvarande värden för den validerade referensmetoden. Metodens tillförlitlighet, såväl som metodens förmåga att korrekt identifiera irriterande kemikalier i kategori 2 enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen och, beroende på den rättsliga ram som gäller för de uppgifter som tas fram, även metodens förmåga att korrekt identifiera 'ingen kategori'-kemikalier enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen, bör bestämmas innan metoden används för testning av nya kemikalier.

4. Dessa prestandastandarder baserar sig på EC-ECVAM:s prestandastandarder (8) som uppdaterats enligt FN:s GHS eller CLP-förordningens system för klassificering och märkning (1) (3). De ursprungliga prestandastandarderna fastställdes efter att valideringsstudien hade slutförts (21) och baserade sig på EU-klassificeringssystemet enligt kommissionens direktiv 2001/59/EG av den 6 augusti 2001 om anpassning till tekniska framsteg för tjugotonde gången av rådets direktiv 67/548/EEG om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen⁽¹⁾. Till följd av att FN:s GHS-system för klassificering och märkning antogs i EU (CLP-förordningen) (3), vilket gjordes mellan slutförandet av valideringsstudien och slutförandet av denna testmetod (8), har prestandastandarderna uppdaterats. Uppdateringen gäller främst ändringar av i) uppsättningen referenskemikalier för prestandastandarderna och ii) de värden som fastställts för tillförlitlighet och exakthet (2) (23).

PRESTANDASTANDARDER FÖR IN VITRO-TESTMETODER MED Rhe FÖR HUDIRRITATION

5. Prestandastandarderna består av följande tre element (9):

- I. Testmetodens grundläggande komponenter
- II. En minimiförteckning med referenskemikalier.
- III. Definierade värden för tillförlitlighet och exakthet.

I. Testmetodens grundläggande komponenter

6. Dessa består av de grundläggande strukturella, funktionella och förfarandemässiga delarna i en validerad metod som bör ingå i protokollet för en föreslagen mekaniskt och funktionellt liknande eller modifierad metod. Dessa komponenter omfattar metodens unika egenskaper, kritiska förfarandemässiga detaljer och åtgärder för kvalitetskontroll. Att följa testmetodens grundläggande komponenter hjälper till att säkerställa att liknande eller modifierade metoder baserar sig på samma koncept som den motsvarande validerade referensmetoden (9). Testmetodens grundläggande komponenter beskrivs i detalj i punkterna 16–21 i testmetoden och testningen bör utföras enligt följande:

- Allmänna villkor (punkt 16).
- Funktionella villkor, som omfattar
 - viabilitet (punkt 17),
 - barriärfunktion (punkt 18),
 - morfologi (punkt 19),
 - reproducerbarhet (punkt 20), och
 - kvalitetskontroll (punkt 21).

II. Minimiförteckning över referenskemikalier

7. Referenskemikalier används för att bestämma tillförlitligheten och exaktheten hos en föreslagen liknande eller modifierad metod som har påvisats vara strukturellt och funktionellt tillräckligt motsvarande den validerade referensmetoden eller som representerar en mindre modifiering av en av de tre validerade metoderna, är jämförbar med eller är bättre än den validerade referensmetoden (2) (8) (16) (23). De 20 rekommenderade referenskemikalierna som förtecknas i tabell 1 omfattar kemikalier som representerar olika kemiska klasser (dvs. kemiska kategorier på grundval av funktionella grupper) och är representativa för hela skalan av Draizes irritationspoäng (från icke-irriterande till kraftigt irriterande). Kemikalierna i denna förteckning består av tio kemikalier i kategori 2 enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen och tio icke-kategoriserade kemikalier, av vilka tre är frivilliga kemikalier i kategori 3 enligt FN:s GHS. Enligt denna testmetod anses den valfria kategorin 3 som 'ingen kategori'. Kemikalierna som förtecknas i tabell 1 är valda från de kemikalier som använts i optimeringsfasen som följde på förvalidering och i valideringsstudien för den validerade referensmetoden, med avseende på kemisk funktionalitet och fysikaliskt tillstånd (14) (18). Dessa referenskemikalier representerar det minsta antal kemikalier som bör användas för att utvärdera exaktheten och tillförlitligheten för föreslagna liknande eller modifierade metoder, men bör inte användas när nya metoder tas fram. I situationer där en kemikalie enligt förteckningen inte finns att tillgå, kan man använda andra kemikalier för vilka det finns adekvata *in vivo*-referensdata, primärt från de kemikalier som använts i optimeringsfasen som följt på förvalideringen eller valideringsstudien för den validerade referensmetoden. Om man vill kan ytterligare kemikalier från andra kemiska klasser för vilka det finns adekvata *in vivo*-referensdata läggas till minimiförteckningen över referenskemikalier för ytterligare utvärdering av den föreslagna testmetodens exakthet.

⁽¹⁾ EGT L 225, 21.8.2001, s. 1.

Tabell 1

Minimiförteckning över referenskemikalier för bestämning av exakthet och tillförlitlighet för liknande eller modifierade RhE-metoder för hudirritation ⁽¹⁾

Kemikalie	CAS-nummer	Fysikaliskt tillstånd	In vivo-gradering	Validerad referensmetod in vitro-kat.	FN:s GHS eller EU:s CLP in vivo-kat.
1-brom-4-klorbutan	6940-78-9	Vätska	0	Kat. 2	Ingen kat.
dietylftalat	84-66-2	Vätska	0	Ingen kat.	Ingen kat.
naftalenättiksyra	86-87-3	Fast ämne	0	Ingen kat.	Ingen kat.
allylfenoxiacetat	7493-74-5	Vätska	0,3	Ingen kat.	Ingen kat.
isopropanol	67-63-0	Vätska	0,3	Ingen kat.	Ingen kat.
4-metyltiobensaldehyd	3446-89-7	Vätska	1	Kat. 2	Ingen kat.
metylstearat	112-61-8	Fast ämne	1	Ingen kat.	Ingen kat.
heptylbutyrat	5870-93-9	Vätska	1,7	Ingen kat.	Ingen kat.
hexylsalicylat	6259-76-3	Vätska	2	Ingen kat.	Ingen kat.
kanelaldehyd	104-55-2	Vätska	2	Kat. 2	Ingen kat. (Valfri kat. 3) ⁽³⁾
1-dekanol ⁽²⁾	112-30-1	Vätska	2,3	Kat. 2	Kat. 2
cyklamenaldehyd	103-95-7	Vätska	2,3	Kat. 2	Kat. 2
1-bromhexan	111-25-1	Vätska	2,7	Kat. 2	Kat. 2
2-klormetyl-3,5-dimetyl-4-metoxipyridin HCl	86604-75-3	Fast ämne	2,7	Kat. 2	Kat. 2
di-n-propyldisulfid ⁽²⁾	629-19-6	Vätska	3	Ingen kat.	Kat. 2
kaliumhydroxid (5 % vattenlösning)	1310-58-3	Vätska	3	Kat. 2	Kat. 2
bensentiol, 5-(1,1-dimetyletyl)-2-metyl	7340-90-1	Vätska	3,3	Kat. 2	Kat. 2
1-metyl-3-fenyl-1-piperazin	5271-27-2	Fast ämne	3,3	Kat. 2	Kat. 2
heptanal	111-71-7	Vätska	3,4	Kat. 2	Kat. 2
tetrakloretylen	127-18-4	Vätska	4	Kat. 2	Kat. 2

⁽¹⁾ Urvalet kemikalier baserar sig på följande kriterier: i) kemikalierna finns kommersiellt tillgängliga, ii) de är representativa för hela skalan av Draizes irritationspoäng (från icke-irriterande till kraftigt irriterande), iii) de har en väl definierad kemisk struktur, iv) de är representativa för den kemiska funktionalitet som används i valideringsprocessen och v) de är inte förknippade med någon extremt toxisk profil (t.ex. karcinogena eller toxiska för reproduktionssystemet) och de är inte förknippade med orimliga bortskaffningskostnader.

⁽²⁾ Kemikalier som är irriterande på kanin men för vilka det finns tillförlitliga belägg om att de inte är irriterande för människor (31) (32) (33).

⁽³⁾ Enligt FN:s GHS, inte enligt CLP-förordningen.

III. Definierade värden för tillförlitlighet och exakthet.

8. För att etablera tillförlitligheten och relevansen för föreslagna liknande eller modifierade metoder som kan överföras mellan laboratorier bör alla 20 referenskemikalierna i tabell 1 testas i minst tre laboratorier. Om den föreslagna metoden endast ska användas i ett enskilt laboratorium krävs inte testning i flera laboratorier för valideringen. Det är ändå av största vikt att sådana valideringsstudier bedöms fristående av internationellt erkända valideringsorgan, i enlighet med internationella riktlinjer (9). Alla 20 referenskemikalierna ska i varje laboratorium testas vid tre oberoende omgångar som genomförs med olika vävnadsuppsättningar och med tillräckliga tidsintervaller mellan varandra. Varje omgång ska minst bestå av tre parallellt testade vävnadsbitar för varje berörd testkemikalie, negativ kontroll och positiv kontroll.
9. Vid beräkningen av värden för tillförlitlighet och exakthet för den föreslagna metoden bör alla de fyra nedan angivna kriterierna beaktas, för att garantera att tillförlitlighet och relevans bestäms på ett förhandsdefinierat och enhetligt sätt:
 1. Endast data från testomgångar som ingår i fullständiga sekvenser får användas för beräkning av metodens variabilitet inom och mellan laboratorier och förutsäggande kapacitet (exakthet).
 2. Den slutliga klassificeringen för varje referenskemikalie i varje deltagande laboratorium ska göras genom att använda viabilitetsmedelvärden för de olika omgångarna som ingår i en fullständig sekvens.
 3. Endast data som erhållits för kemikalier för vilka det har gjorts fullständiga sekvenser av testomgångar i alla deltagande laboratorier får användas för beräkning av metodens variabilitet mellan laboratorier.
 4. Värdena för exakthet ska beräknas på grundval av de enskilda laboratoriernas förutsägelser som erhållits för de 20 referenskemikalierna vid de olika deltagande laboratorierna.

I detta sammanhang avses med **sekvens av omgångar** tre oberoende testomgångar vid ett laboratorium för en testkemikalie. En **fullständig sekvens av omgångar** är en sekvens för en testkemikalie vid ett laboratorium där alla tre testomgångarna är giltiga. Det betyder att en enskild ogiltig omgång gör hela sekvensen på tre omgångar ogiltig.

Reproducerbarhet inom laboratorier

10. En utvärdering av reproducerbarheten inom ett laboratorium bör ge en konkordans för klassificeringar (kategori 2 och 'ingen kategori' enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen) som erhålls i olika och oberoende testomgångar med de 20 referenskemikalierna vid ett enda laboratorium. Konkordansen ska vara lika med eller högre ($\geq$) än 90 %.

Reproducerbarhet mellan laboratorier

11. En utvärdering av reproducerbarheten mellan laboratorier är inte nödvändig om den föreslagna metoden endast ska användas vid ett enskilt laboratorium. För metoder som ska överföras mellan laboratorier ska den konkordans för klassificeringarna (kategori 2 och 'ingen kategori' enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen) som erhålls i olika och oberoende testomgångar med de 20 referenskemikalierna mellan helst minst tre laboratorier vara lika med eller högre ($\geq$) än 80 %.

Förutsäggande kapacitet (exakthet)

12. Exaktheten (känslighet, specificitet och total exakthet) för den föreslagna liknande eller modifierade metoden bör vara jämförbar med eller bättre än exaktheten för den validerade referensmetoden, med beaktande av tilläggsinformation rörande relevans hos arten i fråga (tabell 2). Känsligheten ska vara lika med eller högre ($\geq$) än 80 % (2) (8) (23). Det finns också en ytterligare särskild begränsning som gäller för känsligheten hos den föreslagna *in vitro*-metoden såtillvida att endast två *in vivo*-kemikalier i kategori 2, *1-dekanol* och *di-n-propyldisulfid*, får klassificeras felaktigt som 'ingen kategori' av fler än ett deltagande laboratorium. Specificiteten ska vara lika med eller högre ($\geq$) än 70 % (2) (8) (23). Det finns inga ytterligare begränsningar rörande specificiteten för den föreslagna *in vitro*-metoden, dvs. de deltagande laboratorierna får felklassificera *in vivo*-kemikalier som 'ingen kategori' så länge som testmetodens slutliga specificitet ligger inom det godtagbara området. Den totala exaktheten ska vara lika med eller högre ($\geq$) än 75 % (2) (8) (23). Även om den validerade referensmetodens känslighet beräknad för de 20 referenskemikalierna som förtecknas i tabell 1 är lika med 90 %, är det definierade minimivärdet för känsligheten som krävs för alla liknande eller modifierade metoder som övervägs satt till 80 %, eftersom både *1-dekanol* (en gränskemikalie) och *di-n-propyldisulfid* (falsk negativ i den validerade referensmetoden) är kända för att vara icke-irriterande för människa (31) (32) (33), även om de identifieras som irriterande ämnen i kanintest. Eftersom RhE-modellerna är baserade på celler av mänskligt ursprung kan de förutsäga att dessa kemikalier inte är irriterande ('ingen kategori' enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen).

Tabell 2

Förutsägande värden för känslighet, specificitet och total exakthet som krävs för att en liknande eller modifierad metod ska anses vara giltig

Känslighet	Specificitet	Total exakthet
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Kriterier för godkännande av ett försök

13. Det är möjligt att ett eller flera test som hör samman med en eller flera testkemikalier inte uppfyller kriterierna för godkänt för test- och kontrollkemikalierna eller inte kan godkännas av andra orsaker. För att komplettera data som saknas är det tillåtet att för varje testkemikalie göra högst två tilläggstest (omtestning). Det betyder alltså att då även positiv kontroll och negativ kontroll måste testas parallellt vid omtestning får man genomföra högst två extra omgångar för varje testkemikalie.
14. Det är möjligt, även efter omtestning, att det minimiantal på tre giltiga omgångar som krävs för varje testad kemikalie inte erhålls för varje referenskemikalie i varje deltagande laboratorium, och då är den resulterande datamatrixen ofullständig. I sådana fall bör alla följande tre kriterier uppfyllas för att datauppsättningarna ska anses vara godtagbara:
 1. Det bör finnas minst en fullständig sekvens av omgångar för alla 20 referenskemikalierna.
 2. I minst tre deltagande laboratorier måste minst 85 % av sekvenserna vara fullständiga (för 20 kemikalier, dvs. 3 ogiltiga sekvenser tillåts i ett enskilt laboratorium).
 3. Minst 90 % av alla möjliga sekvenser från minst tre laboratorier måste vara fullständiga (för 20 kemikalier som testats i tre laboratorier, dvs. totalt tillåts 6 ogiltiga sekvenser)."
3. Följande kapitel ska läggas till:

"B.49. MIKRONUKLEUSTEST AV DÄGGDJURSCELLER IN VITRO

INLEDNING

1. Mikronukleustest *in vitro* (MNvit) är ett genotoxicitetstest för att upptäcka mikrokärnor i cytoplasmat i interfasceller. Mikrokärnor kan härröra från acentriska kromosomfragment (dvs. en centromer saknas) eller från hela kromosomer som inte kan migrera till polerna under det anafasa steget av celledelningen. Genom testet upptäcks aktiviteten hos klastogena och aneugena kemikalier (ämnen och blandningar) (1) (2) i celler som har genomgått celledelning under eller efter exponering för testämnet. Denna testmetod ger möjlighet att använda protokoll med och utan aktinpolymeriseringsinhibitorn cytokalasin B (cytoB). Tillsättning av cytoB före mitosen gör det möjligt att identifiera och selektivt analysera frekvensen mikrokärnor i celler som har slutfört en mitos eftersom sådana celler är binukleära (3) (4). Denna testmetod gör det också möjligt att använda protokoll utan blockering av cytokines, förutsatt att det finns belägg för att den analyserade cellpopulationen har genomgått mitos.
2. Utöver MNvit-metoden för att identifiera kemikalier (ämnen och blandningar) som inducerar mikrokärnor kan man även använda blockering av cytokines, immunokemisk märkning av kinetochorer eller hybridisering med centromeriska/telomeriska prober (FISH-teknik, Fluorescens *In Situ* Hybridisation) för att få information om mekanismerna för kromosomskador och bildningen av mikrokärnor (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Märknings- och hybridiseringsteknik kan användas när det förekommer ökad bildning av mikrokärnor och man vill slå fast om ökningen är resultatet av klastogena och/eller aneugena händelser.
3. Mikrokärnorna representerar skador som har förmedlats till dotterceller, medan kromosomavvikelser som detekteras i metafasceller inte alltid förmedlas. Eftersom mikrokärnor i interfasceller kan bedömas relativt objektivt, behöver laboratoriepersonalen endast bestämma huruvida cellerna har genomgått delning eller inte och hur många celler som innehåller mikrokärna. Därför kan detekteringen göras relativt snabbt och analysen kan automatiseras. Då kan man detektera tusentals i stället för hundratals celler per behandling, vilket ökar försökets tyngd. Eftersom mikrokärnor kan uppstå från isolerade kromosomer finns det också möjlighet att detektera aneuploidiframkallande ämnen som är svåra att undersöka genom konventionella kromosomavvikelsestest, t.ex. OECD:s testriktlinje 473 (kapitel B.10 i denna bilaga) (17). MNvit-metoden ger dock inte möjlighet att utan särskilda tekniker såsom FISH enligt beskrivningen i punkt 2 skilja mellan kemikalier som inducerar polyploidi från sådana kemikalier som inducerar klastogenicitet.

4. MNvit-metoden är en *in vitro*-metod där man i regel använder odlade celler från människa eller gnagare. Metoden ger tillgång till en omfattande bas för undersökning av kromosomskadepotentialen *in vitro* eftersom både aneugener och klastogener kan upptäckas.
5. MNvit-metoden är robust och effektiv för ett flertal celltyper, med eller utan tillsats av cytoB. Det finns omfattande data som stöd för att MNvit-metoden är giltig för ett flertal gnagarcellinjer (CHO, V79, CHL/IU och L5178Y) och lymfocyter från människa (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Dessa data kommer bland annat från internationella valideringsstudier samordnade av Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22) och rapporter från International Workshop on Genotoxicity Testing (4) (16). Tillgängliga data har också omvaliderats i en retrospektiv sammanvägd (weight-of-evidence) valideringsstudie vid Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (ECVAM), och testmetoden har erkänts som vetenskapligt giltig av ECVAM:s vetenskapliga rådgivande kommitté (ESAC) (32) (33) (34). Man har beskrivit användningen av TK6 lymfoblastoidceller från människa (35), HepG2-celler (36) (37) och embryoceller från syrisk hamster (38), även om de inte har använts i valideringsstudier.

DEFINITIONER

6. Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

7. För testning *in vitro* krävs i regel ett exogent system för metabolisk aktivering, om cellerna inte är metaboliskt kompetenta i fråga om de ämnen som testas. Det exogena metaboliska aktiveringssystemet efterliknar inte helt förhållandena *in vivo*. Man bör också se till att undvika sådana förhållanden som leder till artefaktiska positiva resultat som inte återspeglar den verkliga mutageniciteten och kan ha sin orsak i faktorer såsom markerade ändringar av pH eller osmolalitet eller hög cytotoxicitet (39) (40) (41). Om testkemikalien orsakar ändring av pH i mediet vid tillsättningsstidpunkten bör pH justeras, företrädesvis genom buffring av stamlösningen så att alla volymer hålls lika stora vid alla testkoncentrationer och för alla kontroller.
8. För analysen av induktion av mikrokärnor är det av central betydelse att mitos har inträffat i både de behandlade och obehandlade odlingarna. Det mest informativa stadiet för detektering av mikrokärnor är när cellerna har slutfört en mitos under eller efter behandling med testämnet.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

9. Cellodlingar från människa eller däggdjur exponeras för testämnet både med och utan exogent metaboliskt aktiveringssystem, utom om de celler som används har tillräcklig metaboliserande kapacitet. Parallella kontroller med lösningsmedel/vehikel och positiva kontrollkemikalier ska ingå i alla test.
10. Under eller efter exponering för testämnet odlas cellerna tillräckligt länge för att kromosomskador eller spindel-fiberskador ska leda till att mikrokärnor bildas i interfascellerna. För induktion av aneuploidi bör testämnet i regel finnas närvarande under mitosen. Interfascellerna skördas och färgas in och närvaron av mikrokärnor analyseras. Idealiskt sett bör man för detekteringen av mikrokärnor endast använda celler som har slutfört mitosen under exponeringen för testämnet eller under perioden efter exponeringen, om en sådan används. I odlingar som har behandlats med en cytokinesinhibitor uppnås detta genom att endast analysera binukleära celler. Om blockering av cytokines inte används är det viktigt att påvisa att de analyserade cellerna sannolikt har genomgått celldelning under eller efter exponeringen för testämnet. Oavsett protokoll är det viktigt att påvisa att cellproliferation har skett både i kontrollodlingarna och de behandlade odlingarna, och omfattningen av testämneshinducerad cytotoxicitet eller cytostas ska bedömas i de odlingar (eller parallella odlingar) som är föremål för analys av mikrokärnor.

TESTBESKRIVNING

Förberedelser

11. Man kan använda odlade primära perifera blodlymfocyter från människa (5) (19) (42) (43) och celler från ett antal gnagarcellinjer såsom CHO, V79, CHL/IU och L5178Y (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Användning av andra cellinjer och celltyper bör motiveras på grundval av deras påvisade prestanda med denna metod, enligt det som anges i avsnittet om kriterier för godkännande. Eftersom bakgrunds förekomsten av mikrokärnor påverkar försökets känslighet, rekommenderas att man använder celltyper med en låg stabil bakgrunds förekomst av mikrokärnbildning.

12. De humana perifer blodlymfocyterna ska tas från unga (cirka 18–35 år) rökfria individer utan tidigare känd exponering för genotoxiska kemikalier eller strålning. Om celler från fler än en givare poolas för användning bör antalet givare anges. Förekomsten av mikrokärnor ökar med åldern och denna trend är mera markerad hos kvinnor än hos män (44), vilket bör beaktas när man väljer celler för pooling.

Medier och odlingsbetingelser

13. Lämpliga odlingsmedier och inkubationsförhållanden (odlingskärl, CO₂-halt, temperatur och luftfuktighet) bör väljas för odlingarna. Etablerade cellinjer och stammar bör rutinmässigt kontrolleras med avseende på det modala kromosomantalets stabilitet och frånvaro av kontaminerad mykoplasma, och får inte användas om kontamination har skett eller om det modala kromosomantalet har ändrats. Den normala cellcykeltiden vid de odlingsbetingelser som används i laboratoriet bör vara känd. Om blockering av cytokines används bör koncentrationen av cytokinesinhibitor vara optimerad för den berörda celltypen och bör även ha påvisats kunna ge en god skörd av binukleära celler för analys.

Beredning av odlingarna

14. Etablerade cellinjer och stammar: celler dras upp från stamkulturer, inokuleras i ett odlingsmedium vars densitet är sådan att det inte sker sammanväxning i enkelskiktsoodlingar och att suspensionsodlingar inte når för hög densitet före skörden, och inkuberas vid 37 °C.
15. Lymfocyter: helblod behandlat med en antikoagulant (t.ex. heparin) eller separerade lymfocyter odlas i ett medium som innehåller en mitogen (t.ex. fytohemagglutinin) före exponering för testämnet och cytoB.

Metabolisk aktivering

16. Exogena metaboliserande system bör användas när cellerna inte har tillräcklig endogen metabolisk kapacitet. Det mest använda systemet är en kofaktorstött post-mitokondriell fraktion (S9) beredd ur lever från gnagare som behandlats med enzyminducerande ämnen såsom Aroclor 1254 (45) (46) eller en kombination av fenobarbiton och β -naftoflavon (46) (47) (48) (49). Den senare kombinationen bryter inte mot Stockholmkonventionen om långlivade organiska föroreningar (50) eller förordning (EG) nr 850/2004 om långlivade organiska föroreningar (66) och har visat sig vara lika effektiv som Aroclor 1254 när det gäller att inducera monooxygenaser ('mixed-function oxidases') (46) (47) (48) (49). S9-fraktionen används typiskt i koncentrationer mellan 1–10 % (volym/volym) i det slutliga testmediet. Förhållandena i ett system för metabolisk aktivering kan bero på vilken klass av kemikalie som testas och i vissa fall kan det vara lämpligt att använda mer än en S9-koncentration.
17. Genetiskt framställda cellinjer som uttrycker specifika aktiverande enzymer för människa eller gnagare kan eliminera behovet av ett exogent system för metabolisk aktivering och kan användas som testceller. I sådana fall bör valet av cellinjer underbyggas vetenskapligt, t.ex. genom monooxygenasernas relevans för testämnets metabolism (51) och deras respons på kända klastogener och aneugener (se avsnittet om kriterier för godkännande). Här bör konstateras att de ämnen som testas kanske inte metaboliseras av monooxygenaser, och i sådana fall indikerar negativa resultat inte att testämnet inte kan inducera mikrokärnor.

Beredning av testämnet

18. Fasta kemikalier bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och vid behov spädas ut innan cellerna behandlas. Flytande kemikalier kan tillsättas direkt till testsystemen och/eller spädas ut före behandlingen. Gaser eller flyktiga kemikalier bör testas genom lämpliga modifikationer av standardprotokollen, såsom behandling i slutna kärl (52) (53). Testämneshandlingarna bör vara färska, utom om stabilitetsdata visar att lagring kan godkännas.

Försöksbetingelser

Lösningsmedel/vehiklar

19. Lösningsmedlet/vehikeln får inte reagera med testämnet, leda till att cellerna inte överlever eller att S9-aktiviteten inte kan upprätthållas vid den använda koncentrationen. Om andra än väletablerade lösningsmedel/vehiklar (t.ex. vatten, cellodlingsmedier, dimetylsulfoxid) används bör detta motiveras med data om deras förenlighet med testämnet och avsaknad av genetisk toxicitet. Det rekommenderas att man alltid när det är möjligt överväger vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar som första alternativ.

Användning av cytoB som cytokinesinhibitor

20. En av de viktigaste faktorerna när det gäller MNvit-metodens resultat är att se till att de celler som analyseras har slutfört mitosen under behandlingen eller under eventuell inkubationsperiod efter behandlingen. CytoB är det ämne som oftast används för blockering av cytokines eftersom det hindrar aktinbildning och således hindrar separationen av dotterceller efter mitosen så att binukleära celler kan bildas (5) (54) (55). Analysen av mikrokärnor kan då begränsas till celler som har genomgått mitos under eller efter behandlingen. Samtidigt kan man mäta testämnets effekt på cellproliferationskinetiken. CytoB ska användas som cytokinesinhibitor när humana lymfocyter används eftersom cellcykeltiderna varierar mellan odlingar och mellan givare och eftersom inte alla lymfocyter ger respons på fytohemagglutinin. Även andra metoder har använts vid testning av cellinjer för att bestämma om de celler som analyseras har delat sig; dessa metoder behandlas nedan (se punkt 26).
21. Laboratoriet bör fastställa lämplig koncentration av cytoB för varje celltyp i syfte att nå optimal förekomst av binukleära celler i kontrollodlingarna för lösningsmedel/vehikel. Lämplig cytoB-koncentration är i regel 3–6 µg/ml.

Mätning av cellproliferation och cytotoxicitet och val av exponeringskoncentrationer

22. Vid bestämning av den högsta testämneskoncentrationen ska man undvika koncentrationer som kan ge artefaktiska positiva resultat, t.ex. för kraftig cytotoxicitet, utfällning i odlingsmediet och markerade ändringar av pH eller osmolalitet (39) (40) (41).
23. Cellproliferationen bör mätas för att se till att de behandlade cellerna har genomgått mitos under försöket och att behandlingarna görs på lämpliga nivåer av cytotoxicitet (se punkt 29). Om cytoB inte används ska cytotoxiciteten bestämmas med och utan metabolisk aktivering i celler som kräver metabolisk aktivering, med användning av den relativa ökningen av antalet celler eller relativ populationsfördubbling (se tillägg 2 för formuler). När cytoB används kan cytotoxiciteten bestämmas med användning av replikeringsindex (se tillägg 2 för formel).
24. Behandling av odlingarna med cytoB och mätning av de relativa förekomsterna av mononukleära, binukleära och multinukleära celler i odlingen är en exakt metod för kvantifiering av effekten på cellproliferationen och behandlingens cytotoxiska eller cytostatiska aktivitet (5) och säkerställer att endast celler som har delat sig under eller efter behandlingen analyseras.
25. I försök där cytoB används kan cytostas/cytotoxicitet kvantifieras genom att bestämma proliferationsindex vid cytokinesinhibering (Cytokinesis-Block Proliferation Index, CBPI) (5) (26) (56) eller härledas från replikeringsindex (RI) från minst 500 celler per odling (se tillägg 2 för formuler). När cytoB används för att bedöma cellproliferation bör CBPI eller RI bestämmas på grundval av minst 500 celler per odling. Dessa åtgärder och andra kan användas för att uppskatta cytotoxiciteten genom jämförelse av värden för behandlade odlingar och kontrollodlingar. Bedömning av andra markörer för cytotoxicitet (t.ex. sammanväxning, cellantal, apoptos, nekros, antalet metafaser) kan ge värdefull information.
26. I studier utan cytoB är det nödvändigt att påvisa att de celler i odlingen som analyseras har genomgått delning under eller efter behandling med testämnet. Annars kan man få falsk negativ respons. Till de metoder som har använts för att se till att cellerna som analyseras har delat sig hör tillsättning och därpå följande detektering av bromodeoxiuridin (BrdU) för att identifiera celler som har delat sig (57), bildning av kloner när celler från permanenta cellinjer behandlas och analyseras *in situ* på ett objektglas (proliferationsindex (PI)) (25) (26) (27) (28) eller mätning av relativ populationsfördubbling (RPD) eller relativ ökning av celltal (RICC) eller andra prövade metoder (16) (56) (58) (59) (se tillägg 2 för formuler). Bedömning av andra markörer för cytotoxicitet eller cytostas (t.ex. sammanväxning, celltal, apoptos, nekros, antal metafaser) kan ge värdefull information.
27. Minst tre analyserbara testkoncentrationer bör utvärderas. För att uppnå detta kan det vara nödvändigt att genomföra försöket med ett större antal nära varandra liggande koncentrationer och analysera bildningen av mikrokärnor i de koncentrationer som ger en lämplig cytotoxicitetsskala. En alternativ strategi är att utföra ett preliminärt cytotoxicitetstest för att få ett snävt intervall för det definitiva testet.
28. Den högsta koncentrationen ska vara avsedd att ge en cytotoxicitet på $55 \pm 5\%$. Högre nivåer kan inducera kromosomskada som en bieffekt av cytotoxicitet (60). När det uppstår cytotoxicitet ska de valda testkoncentrationerna täcka en skala som sträcker sig från den koncentration som ger $55 \pm 5\%$ cytotoxicitet till den som ger liten eller ingen cytotoxicitet.

29. Om ingen cytotoxicitet eller utfällning observeras ska de högsta testkoncentrationerna motsvara 0,01 M, 5 mg/ml eller 5 µl/ml, enligt det som är lägst. De koncentrationer som väljs för analys ska i regel vara separerade med högst 10. För testämnen som har en brant koncentration-responskurva kan det vara nödvändigt att använda närmare liggande testämnescykler så att odlingarna i intervallen för moderat och låg toxicitet också blir analyserade.
30. Om lösligheten är en begränsande faktor ska den högsta koncentrationen, förutsatt att denna inte begränsas av cytotoxicitet, vara den lägsta koncentration vid vilken minimal utfällning är synlig i odlingarna, förutsatt att analysen inte störs. Utvärdering av utfällning bör göras med metoder som ljusmikroskopi med detektering av utfällning som består eller uppstår under odlingen (vid slutet av behandlingen).

Kontrollgrupper

31. Parallella positiva och negativa kontroller (lösningsmedel eller vehikel), både med och utan metabolisk aktivering, bör inkluderas i varje försök.
32. Positiva kontroller behövs för att påvisa cellernas och testprotokollets förmåga att identifiera klastogener och aneugener och att bekräfta S9-preparatets metaboliska förmåga. För den positiva kontrollen bör man använda kända inducerare av mikrokärnbildning vid koncentrationer som förväntas ge små men reproducerbara öknings över bakgrundsnivån och påvisa testsystemets känslighet. Koncentrationerna för de positiva kontrollerna bör väljas på ett sådant sätt att effekterna är tydliga men inte omedelbart avslöjar de kodade objektglasens identitet för den som gör avläsningarna.
33. En klastogen som kräver metabolisk aktivering (t.ex. cyklofosamid, benzo(a)pyren) bör användas för att påvisa den metaboliska förmågan och testsystemets förmåga att detektera klastogener. Om det är motiverat kan andra positiva kontroller användas. Eftersom vissa positiva kontroller som kräver metabolisk aktivering i vissa behandlingsförhållanden eller för vissa cellinjer kan vara aktiva utan exogen metabolisk aktivering, bör behovet av metabolisk aktivering och aktiviteten hos S9-preparaten testas i de valda cellinjerna och vid de valda koncentrationerna.
34. För närvarande känner man inte till några aneugener som kräver metabolisk aktivering för sin genotoxiska aktivitet (16). Positiva kontroller som för närvarande är godkända för aneugen aktivitet är t.ex. kolchicin och vinblastin. Andra kemikalier kan användas om de endast eller primärt inducerar mikrokärnor genom aneugen aktivitet. För att det inte ska behövas två positiva kontroller (för klastogenicitet och aneugenicitet) utan metabolisk aktivering, kan aneugenicitetskontrollen tjäna som positiv kontroll utan S9, och klastogenicitetskontrollen kan användas för att testa lämpligheten för det system som används för metabolisk aktivering. De positiva kontrollerna för klastogenicitet och aneugenicitet bör användas för celler som inte kräver S9. Förslag på positiva kontroller finns i tillägg 3.
35. Användning av positiva kontroller relaterade till kemisk klass kan också övervägas när lämpliga kemikalier finns att tillgå. Alla positiva kontroller bör vara lämpliga för celltypen och aktiveringsförhållandena.
36. Lösningssmedels-/vehikelkontroller bör ingå för varje skördningstidpunkt. Dessutom bör man använda obehandlade negativa kontroller (utan lösningssmedel/vehikel), utom om det finns offentligt gjorda data eller laboratoriet har historiska data som påvisar att det valda lösningssmedlet inte inducerar genotoxiska eller andra skadliga effekter vid de koncentrationer som används.

TESTFÖRFARANDE

Behandlingsschema

37. För att maximera sannolikheten för att detektera en aneugen eller klastogen som agerar i ett visst skede av cellcykeln är det viktigt att tillräckligt antal celler behandlas med testämnet under cellcykelns alla skeden. Behandlingsschemat för cellinjer och primära cellodlingar kan därför avvika något från behandlingsschemat för lymfocyter som kräver mitogen stimulering för att inleda sin cellcykel; dessa behandlas i punkterna 41–43 (16).
38. Teoretiska överväganden och offentligt gjorda data (18) tyder på att de flesta aneugener och klastogener detekteras med en kortvarig behandlingsperiod på 3–6 timmar med och utan tillsats av S9, åtföljd av borttagning av testämnet och en tillväxtperiod på 1,5–2,0 cellcykler (6). Cellerna skördas vid en tidpunkt som motsvarar cirka 1,5–2,0 gånger den normala (dvs. obehandlade) cellcykelns längd efter att behandlingen inletts eller vid avslutad behandling (se tabell 1). Provtagnings- eller skördningstidpunkterna kan senareläggas om det är känt eller man misstänker att testämnet påverkar cellcykelns längd (t.ex. vid testning av nukleosidanaloger).

39. Eftersom S9-preparat är potentiellt cytotoxiska för odlade däggdjursceller används en förlängd exponeringsbehandling på 1,5–2,0 gånger normal cellcykel endast när S9 inte ingår. Vid förlängd behandling finns det alternativ där man har möjlighet att behandla cellerna med testkemikalie utan eller med cytoB. Dessa alternativ gäller för situationer där det kan finnas tvivel rörande eventuell växelverkan mellan testämnet och cytoB.
40. Förslag till cellbehandlingsscheman finns i tabell 1. Dessa allmänna behandlingsscheman kan modifieras beroende på testämnets stabilitet eller reaktivitet eller de särskilda tillväxtegenskaper som gäller för de celler som används. Alla behandlingar bör inledas och avslutas medan cellerna är i exponentiell tillväxtfas. Dessa scheman presenteras i närmare detalj i punkterna 41–47 nedan.

Tabell 1

Tidpunkter för cellbehandling och skörd när MNvit-metoden används

Lymfocyter, primära celler och cellinjer behandlade med cytoB	+ S9	Behandla 3–6 timmar med tillsats av S9, avlägsna S9 och behandlingsmedium, tillsätt färskt medium och cytoB, skörda efter 1,5–2,0 normala cellcykler.
	– S9 Kort exponering	Behandla 3–6 timmar, avlägsna behandlingsmedium, tillsätt färskt medium och cytoB, skörda efter 1,5–2,0 normala cellcykler.
	– S9 Förlängd exponering	Alternativ A: Behandla under 1,5–2 normala cellcykler med tillsats av cytoB, skörda i slutet av exponeringsperioden. Alternativ B: Behandla under 1,5–2,0 normala cellcykler, avlägsna testämnet, tillsätt färskt medium och cytoB, skörda efter 1,5–2,0 normala cellcykler.

Cellinjer som behandlas utan cytoB
(samma som de behandlingsscheman som anges ovan utom att cytoB inte tillsätts)

Lymfocyter, primära celler och cellinjer med cytoB

41. För lymfocyter är det effektivast att starta exponeringen för testämnet 44–48 timmar efter stimulering med fytotagglutin, när cykelsynkroniseringen har fallit bort (5). I det första försöket behandlas cellerna 3–6 timmar med testämnet med och utan tillsats av S9. Behandlingsmediet avlägsnas och ersätts med färskt medium som innehåller cytoB och cellerna skördas efter 1,5–2,0 normala cellcykler.
42. Om båda de initiala försöken med kort (3–6 timmar) behandling är negativa eller tvetydiga görs en efterföljande förlängd exponeringsbehandling utan S9. Det finns två likvärdigt godkända behandlingsalternativ att tillgå. Det kan dock vara lämpligare att använda alternativ A för stimulerade lymfocyter i fall där den exponentiella tillväxten kan minska vid 96 timmar efter stimulering. Likaså ska cellodlingarna inte ha nått sammanväxning vid den slutliga skörningstiden i alternativ B.
- Alternativ A: Cellerna behandlas med testämnet under 1,5–2,0 normala cellcykler och skördas vid behandlingstidens slut.
 - Alternativ B: Cellerna behandlas med testämnet under 1,5–2,0 normala cellcykler. Behandlingsmediet avlägsnas och ersätts med färskt medium och cellerna skördas efter ytterligare 1,5–2,0 normala cellcykler.
43. Primära celler och cellinjer ska behandlas på liknande sätt som lymfocyterna, utom att det inte är nödvändigt att stimulera dem med fytotagglutin under 44–48 timmar. Andra celler än lymfocyter ska exponeras så att cellerna vid försökets slut fortfarande är i logfas.

Cellinjer utan cytoB

44. Cellerna behandlas 3–6 timmar med och utan tillsats av S9. Behandlingsmediet avlägsnas och ersätts med färskt medium och cellerna skördas efter 1,5–2,0 normala cellcykler.
45. Om båda de initiala försöken med kort (3–6 timmar) behandling är negativa eller tvetydiga görs en efterföljande förlängd exponeringsbehandling (utan S9). Det finns två likvärdigt godkända behandlingsalternativ att tillgå.
- Alternativ A: Cellerna behandlas med testämnet under 1,5–2,0 normala cellcykler och skördas vid behandlingstidens slut.
 - Alternativ B: Cellerna behandlas med testämnet under 1,5–2,0 normala cellcykler. Behandlingsmediet avlägsnas och ersätts med färskt medium och cellerna skördas efter ytterligare 1,5–2,0 normala cellcykler.
46. I enkelskikt kan det finnas mitotiska celler (som identifieras genom att de är runda och lösgör sig från ytan) i slutet av behandlingen på 3–6 timmar. Eftersom dessa mitotiska celler enkelt lösgörs, kan de förloras när mediet som innehåller testämnet avlägsnas. Man bör vara uppmärksam på att samla in dem när odlingarna tvättas och återbörda dem till odlingarna, för att undvika förlust av celler som undergår mitos och är utsatta för risk för mikrokärnor vid tidpunkten för skörd.

Antal odlingar

47. Dubbla odlingar bör användas för varje testämneskoncentration och för lösningsmedels-/vehikelodlingarna och de negativa kontrollerna. I fall där laboratoriets historiska data kan påvisa minimala variationer mellan dubbla odlingar kan det vara godtagbart att endast använda en odling. I så fall rekommenderas analys av ett högre antal koncentrationer.

Skörd av celler och beredning av objektglas

48. Varje odling skördas och hanteras separat. Förberedningen av cellerna kan inbegripa hypoton behandling, men detta steg är inte nödvändigt om tillräcklig cellspridning erhålls på annat sätt. Olika tekniker kan användas för preparering av objektglasen förutsatt att man får cellpreparat av hög kvalitet för analysen. Cellernas cytoplasma bör behållas för att ge möjlighet att detektera mikrokärnor och (vid metoden med blockering av cytokines) tillförlitlig identifiering av binukleära celler.
49. Objektglasen kan färgas med olika metoder, såsom Giemsa eller fluorescerande DNA-specifika färgämnen (59). Användningen av ett DNA-specifikt färgämne (t.ex. akridinorange (61) eller Hoechst 33258 plus pyronin-Y (62)) kan eliminera några av de artefakter som är associerade med färgämnen som inte är DNA-specifika. Anti-kinetochor-antikroppar, FISH-teknik med panceromera DNA-prober eller primad *in situ*-märkning med panceromerspecifik primer, tillsammans med lämplig DNA-motfärgning kan användas för att identifiera innehållet (kromosom/kromosomfragment) av mikrokärnor om man är intresserad av mekanismer för hur de bildas (15) (16). Andra metoder för differentiering mellan klastogener och aneugener kan användas om de har visat sig vara effektiva.

Analys

50. Alla objektglas, inklusive glasen från lösningsmedels-/vehikelkontrollerna och de positiva och negativa kontrollerna, bör ges en oberoende kodning före analysen med mikroskop. Alternativt kan kodade prover analyseras med användning av ett validerat och automatiskt system för flödescytometri eller bildanalys.
51. I cytoB-behandlade odlingar bör förekomsten av mikrokärnor analyseras i minst 2 000 binukleära celler per koncentration (minst 1 000 binukleära celler per odling, två odlingar per koncentration). Om enkla odlingar används bör minst 2 000 binukleära celler per koncentration analyseras ur odlingen. Om betydligt mindre antal än 1 000 binukleära celler per odling, eller 2 000 om en enkel odling används, finns att tillgå för analys för varje koncentration och en väsentlig ökning av mikrokärnor inte upptäcks, bör testet upprepas med användning av flera celler eller vid mindre toxiska koncentrationer, enligt det som är lämpligt. Man bör se upp med att inte analysera binukleära celler med oregelbunden form eller celler där de två kärnorna avviker betydligt i storlek, inte heller ska binukleära celler förväxlas med dåligt spridda multinukleära celler. Celler som innehåller fler än två huvudkärnor ska inte analyseras för mikrokärnor, eftersom bakgrunds förekomsten av mikrokärnor kan vara högre i dessa celler (63) (64). Analys av mononukleära celler kan godtas om testämnet påvisas stora cytoB-aktiviteten.

52. För cellinjer som testas utan cytoB-behandling bör mikrokärnorna analyseras med minst 2 000 celler per koncentration (minst 1 000 celler per odling, två odlingar per koncentration). Om endast en odling per koncentration används bör minst 2 000 celler analyseras från odlingen.
53. När cytoB används bör proliferationsindex vid cytokinesinhibering (CBPI) eller replikeringsindex (RI) bestämmas för bedömning av cellproliferationen (se tillägg 2) med användning av minst 500 celler per odling. När behandlingar görs utan tillsats av cytoB är det väsentligt att belägg ges för att de celler som analyseras har prolifererat, enligt det som beskrivs i punkterna 24–27.

Kriterier för godkännande

54. Ett laboratorium som vill använda MNvit-testning enligt beskrivningen i denna testmetod bör påvisa sin förmåga att på ett tillförlitligt och exakt sätt detektera kemikalier med känd aneugen och klastogen aktivitet, med och utan metabolisk aktivering, såväl som kända negativa kemikalier, med användning av referenskemikalierna enligt tillägg 3. För att påvisa sin förmåga att genomföra testmetoden korrekt bör laboratoriet tillhandahålla belägg för att de celler som analyseras för bildning av mikrokärnor har slutfört en kärndelning, om testningen genomförs utan användning av cytoB.
55. De kemikalier som förtecknas i tillägg 3 rekommenderas som referenskemikalier. Ersättande eller ytterligare kemikalier kan ingå om deras aktivitet är känd och om de inducerar mikrokärnor enligt samma mekanismer och om de kan påvisas vara relevanta för de kemikalier som testas med MNvit-förfarandet. Motiveringen kan innehålla en valideringsstudie där man använt ett brett urval olika ämnen eller fokuserat på ett smalare spektrum baserat på testämnets kemiska klass eller mekanismen för den skada som undersöks.
56. Lösningssmedels-/vehikelkontrollen och obehandlade odlingar bör ge reproducerbart låga och enhetliga förekomster av mikrokärnor (typiskt 5–25 mikrokärnor per 1 000 celler för de celltyper som anges i punkt 11). Andra celltyper kan ha annorlunda responsintervall, vilka bör bestämmas när celltyperna valideras för användning i ett MNvit-förfarande. Data från negativ kontroll, lösningssmedelskontroll och positiv kontroll bör användas för att etablera historiska kontrollintervall. Dessa värden bör användas för att bedöma den parallella negativa eller positiva kontrollens lämplighet för ett försök.
57. Om det föreslås mindre ändringar av protokollet (t.ex. automatiska i stället för manuella analystekniker eller användning av en ny celltyp), bör ändringens effektivitet påvisas innan det modifierade protokollet kan anses vara godkänt för användning. När effektiviteten påvisas måste man också kunna visa att de centrala mekanismerna för kromosombrott och kromosomökning och -förlust kan detekteras och att lämpliga positiva och negativa resultat kan nås för klassen för det enskilda ämne eller för det breda urval av ämnen som ska testas.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

58. Om blockering av cytokines används ska endast förekomsten av binukleära celler med mikrokärnor (oavsett antalet mikrokärnor per cell) användas för utvärderingen av inducering av mikrokärnor. Analys av antalet celler med en, två eller flera mikrokärnor kan ge användbar information men är inte obligatorisk.
59. Parallella mått på cytotoxicitet och/eller cytostas för alla behandlade odlingar och kontrollodlingar med lösningssmedel/vehikel bör bestämmas (58). Proliferationsindex vid cytokinesinhibering (CBPI) eller replikeringsindex (RI) bör beräknas för alla behandlade odlingar och kontrollodlingar som mått på cellcykelfördröjning när blockering av cytokines används. Om cytoB inte tillsätts bör relativ populationsfördubbling (RPD) eller relativ ökning av celltal (RICC) eller proliferationsindex (PI) användas (se tillägg 2).
60. Data bör anges per enskild odling. Dessutom bör alla data sammanfattas i tabellform.
61. Att kemikalier inducerar mikrokärnor i MNvit-metoden kan bero på att de inducerar kromosombrott, kromosomförlust eller en kombination av dessa två. Ytterligare analys med användning av anti-kinetochor-antikroppar, centromerspecifika *in situ*-prober eller andra metoder kan göras för att avgöra huruvida mekanismen för inducering av mikrokärnor beror på klastogen och/eller aneugen aktivitet.

Utvärdering och tolkning av resultaten

62. Det finns inget krav på verifiering genom ytterligare testning av ett tydligt positivt eller negativt svar. Tvetydiga resultat kan förtydligas genom analys av ytterligare 1 000 celler, som tas från alla odlingar för att bibehålla karaktären av blindförsök. Om detta inte klargör resultatet krävs ytterligare testning. Vid uppföljningstestning bör man överväga att modifiera undersökningsparametrarna så att man får en bredare eller snävare skala av förhållanden, enligt det som är lämpligt. Till de undersökningsparametrar som kanske måste ändras ingår koncentrationsintervall, tidpunkten för behandling och skörd av cellerna och/eller betingelserna för metabolisk aktivering.

63. Det finns ett flertal kriterier för att fastställa ett positivt resultat, t.ex. en koncentrationsrelaterad ökning eller en statistiskt signifikant reproducerbar ökning av antalet celler som innehåller mikrokärnor. Man bör i första hand överväga resultatets biologiska relevans. Överväganden om huruvida de observerade värdena ligger inom eller utanför det historiska kontrollintervallet kan ge vägledning för utvärderingen av svarets biologiska betydelse. Lämpliga statistiska metoder kan vara till hjälp vid utvärdering av testresultaten (65). Resultaten från statistisk testning bör dock bedömas utifrån dos-responsförhållandet. Likaså bör reproducerbarhet och historiska data beaktas.
64. Även om de flesta försök ger tydligt positiva eller negativa resultat, kan datauppsättningen i vissa fall inte ge möjlighet att göra en definitiv bedömning av testämnetts aktivitet. Sådana tvetydiga eller tveksamma resultat kan uppstå oavsett hur många gånger försöket upprepas.
65. Positiva resultat från MNvit-testning tyder på att testämnet inducerar kromosombrott eller kromosomförlust i odlade däggdjursceller. Negativa resultat indikerar att testämnet under de gällande försöksbetingelserna inte inducerar kromosombrott och/eller kromosomökning eller -förlust i de odlade däggdjurscellerna.

Testrapport

66. Testrapporten ska innehålla minst följande uppgifter i den mån de är relevanta:

Testkemikalie

- Identifieringsdata och CAS-nummer och EG-nummer.
- Fysikalisk form och renhetsgrad.
- Fysikalisk-kemiska egenskaper av betydelse för studien.
- Testkemikaliens reaktionsbenägenhet med lösningsmedel/vehikel eller cellodlingsmedier.

Lösningsmedel/vehikel

- Motivering för valet av lösningsmedel/vehikel.
- Testämnetts stabilitet och löslighet i lösningsmedlet/vehikeln.

Celler

- Cellernas typ och källa.
- Den använda celltypens lämplighet.
- Frånvaro av mykoplasma, om detta är tillämpligt.
- Uppgifter om cellcykelns längd, fördubblingstid eller proliferationsindex.
- Om lymfocyter används, blodgivarnas kön, ålder och antal, om tillämpligt.
- Om lymfocyter används, uppgift om huruvida helblod eller separata lymfocyter exponeras.
- Antal passager, om detta är tillämpligt.
- Metoder för underhållet av cellodlingar, om detta är tillämpligt.
- Det modala antalet kromosomer.
- Normal cellcykellängd (negativ kontroll).

Testbetingelser

- Identitet för cytokinesinhiberande ämne (t.ex. cytoB), om sådant används, och ämnets koncentration samt cellexponeringens varaktighet
- Motivering för val av koncentrationer och antalet odlingar, även data om cytotoxicitet och löslighetsbegränsningar i den mån dessa data finns att tillgå.

- Mediesammansättning, CO₂-koncentration, om tillämpligt.
- Testämneskoncentrationer.
- Koncentration (och/eller volym) för vehikel och tillsatt testämne.
- Inkubationstemperatur och tid.
- Behandlingens varaktighet.
- Tidpunkten för skörd efter behandlingen.
- Celldensitet vid inokulering, om tillämpligt.
- Typ och sammansättning hos det system som används för metabolisk aktivering, även kriterier för godkännande.
- Positiva kontrollkemikalier och negativa kontroller.
- Metoder för preparering av objektglas och färgningsteknik.
- Kriterier för identifiering av mikrokärnor.
- Antalet analyserade celler.
- Metoder för mätning av cytotoxicitet.
- All tilläggsinformation som är relevant rörande cytotoxicitet.
- Kriterier för att bedöma om testresultaten är positiva, negativa eller tvetydiga.
- Metod(er) för statistisk analys.
- Metoder, såsom användning av kinetochor-antikropp, för att fastställa om mikrokärnorna innehåller hela eller fragmenterade mikrokärnor, om tillämpligt.

Resultat

- Mätningar av cytotoxicitet, t.ex. proliferationsindex (CBPI) eller replikeringsindex (RI) när cytokinesinhibering används, relativ ökning av celltal (RICC), relativ populationsfördubbling (RPD) eller proliferationsindex (PI) när cytokinesinhibering inte används, andra observationer om tillämpligt, t.ex. cellsammanväxning, apoptos, nekros, antalet metafaser, frekvensen binukleära celler.
- Tecken på utfällning.
- Data om behandlingsmediets pH och osmolalitet, om uppmätt.
- Definition av godkända celler för analys.
- Fördelningen av mono-, bi- och multinukleära celler i fall där blockering av cytokines har använts.
- Antalet celler med mikrokärnor angivet separat för varje behandlad odling och kontrollodling och, där det är lämpligt, angivelse av huruvida det gäller binukleära eller mononukleära celler.
- Koncentration-responsförhållande, där det är möjligt.
- Kemiska data om parallella negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontroller (koncentrationer och lösningsmedel).
- Historiska data om negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontroller, med intervall, medelvärden och standardavvikelser samt tillförlitlighetsintervall (t.ex. 95 %).
- Statistisk analys, p-värden om sådana finns.

Diskussion om resultaten

Slutsatser

HÄNVISNINGAR

- (1) Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.*, 392, 1–4.
- (2) Parry, J.M. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. Finns på: www.oecd.org/env/testguidelines

- (18) Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon, G. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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 och *in vitro* CA: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 187–208.
- (24) Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. och 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. och 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. och 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. och 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., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. och 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. och 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. och 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., och 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, Finns på: <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, Finns på: <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. och 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. och 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. och Majer, B.J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotox-icants; current state of knowledge, *Toxicol.*, 198, 315–328.
- (38) Gibson, D.P., Brauningner, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. och 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. och Myhr, B.C. (1991), Interna-tional 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. och 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. och 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. och Zijno, A. (2001), HUman MicroNucleus Project: interna-tional 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. och 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. och 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. och 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. och Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, In: de Serres, F.J., Fouts, J. R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, pp. 85–88.
- (49) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. och 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). Finns på: <http://www.pops.int/>

- (51) Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M. och 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. och McCooey, K.T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, In: Tice, R.R., Costa, D.L. and Schaich, K.M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, sidorna 91–103.
- (53) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. och 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., och 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. och Wakata, A. (2004), Corrigendum to 'Report from the *in vitro* micronucleus assay working group', *Mutation Res.*, 564, 97–100.
- (57) Pincu, M., Bass, D. och Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.*, 139, 61–65.
- (58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och Lee, C. (2003), *In vitro* micronucleus test, In: *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, sidorna 463–467.
- (66) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 850/2004 av den 29 april 2004 om långlivade organiska föreningar och om ändring av direktiv 79/117/EEG (EUT L 158, 30.4.2004, s. 7).

Tillägg 1

Definitioner

Aneugen: Ett ämne eller en process som genom växelverkan med komponenterna i den mitotiska och meiotiska celldelningscykeln leder till aneuploidi i celler eller organismer.

Aneuploidi: Alla avvikelser från det normala antalet diploida (eller haploida) kromosomer med en eller flera kromosomer, men inte med hela uppsättningar kromosomer (polyploidi).

Apoptos: Programmerad celldöd som karakteriseras av en serie steg som leder till sönderfall av celler till membranbundna partiklar som därefter elimineras genom fagocytos eller avstötning.

Cellproliferation: Ökning av antalet celler som resultat av mitotisk celldelning.

Centromer: DNA-regionen i en kromosom där båda kromatiderna är sammanhållna och på vilken båda kinetochorerna är fästa sida vid sida.

Klastogen: Alla ämnen eller processer som orsakar strukturella kromosomavvikelser i populationer av celler eller organismer.

Cytokines: Den celldelning som följer omedelbart efter mitosen vid vilken två dotterceller bildas med var sin enskild kärna.

Proliferationsindex vid cytokinesinhibering (CBPI): Förhållandet mellan antalet celler efter två delningar i den behandlade populationen och motsvarande antal i den obehandlade kontrollen (se tillägg 2 för formel).

Cytostas: Inhibering av celltillväxt (se tillägg 2 för formel).

Cytotoxicitet: Skadliga effekter på cellens struktur eller funktion som i slutändan leder till celldöd.

Genotoxisk: En allmän term som omfattar alla typer av DNA- eller kromosomskador, inklusive brott, adduktomfördelning, mutationer, kromosomavvikelser och aneuploidi. Inte alla typer av genotoxiska effekter leder till mutationer eller stabila kromosomskador.

Interfasceller: Celler som inte är i mitotisk fas.

Kinetochor: Ett protein som innehåller en struktur som fäster sig vid en kromosomcentromer till vilken spindelfibrer associerar under celldelning och ger upphov till en ordnad rörelse av dotterkromosomerna mot dottercellernas poler.

Mikrokärnor: Små extra kärnor som är separata från cellernas huvudkärna och som produceras under mitosens eller meiosens telofas från isolerade kromosomfragment eller hela kromosomer.

Mitos: Delning av cellkärnan, i regel bestående av profas, prometafas, metafase, anafas och telofas.

Mitotiskt index: Den andel celler som är i metafase dividerat med det totala antalet celler som kan observeras i en cellpopulation; en indikation på graden av cellproliferation hos den populationen.

Mutagent ämne: Ämne som producerar en ärftlig ändring av DNA-basparsekvensen (-sekvenserna) i gener eller i kromosomstrukturen (kromosomavvikelser).

Icke-disjunktion: När kromatidpar inte separeras och segregeras korrekt till dottercellerna under utveckling, vilket leder till dotterceller med abnormt antal kromosomer.

Polyploidi: Numeriska kromosomavvikelser i celler eller organismer som inbegriper en eller flera hela kromosomuppsättningar, i motsats till en enskild kromosom eller kromosomer (aneuploidi).

Proliferationsindex (PI): Ett sätt att mäta cytotoxicitet när cytoB inte används (se tillägg 2 för formel).

Relativ ökning av celltal (RICC): Ett sätt att mäta cytotoxicitet när cytoB inte används (se tillägg 2 för formel).

Relativ populationsfördubbling (RPD): Ett sätt att mäta cytotoxicitet när cytoB inte används (se tillägg 2 för formel).

Replikeringsindex (RI): Andelen celldelningscykler som slutförts i en behandlad odling under exponeringsperioden och återhämtningen, i förhållande till den obehandlade kontrollen (se tillägg 2 för formel).

Testkemikalie (kallas också testämne): Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

Tillägg 2

Formler för bestämning av cytotoxicitet

1. När *cytoB* används ska bedömningen av cytotoxicitet basera sig på proliferationsindex vid cytokinesinhibering (CBPI) eller replikeringsindex (RI) (16) (58). Proliferationsindex vid cytokinesinhibering indikerar det genomsnittliga antalet cellcykler per cell under exponeringsperioden för *cytoB* och kan användas för att beräkna cellproliferationen. Replikeringsindex indikerar det relativa antalet kärnor i behandlade odlingar i jämförelse med kontrollodlingar och kan användas för att beräkna procentandelen cystostas:

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

och

T = odling behandlad med testkemikalie
C = vehikellkontrollodling

där

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{Antalet mononukleära celler}) + (2 \times \text{Antalet binukleära celler}) + (3 \times \text{Antalet multinukleära celler}))}{(\text{Totala antalet celler})}$$

Således gäller att ett CBPI-värde på 1 (alla celler är mononukleära) motsvarar 100 % cystostas.

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

$$\text{RI} = \frac{((\text{Antalet binukleära celler}) + (2 \times \text{Antalet multinukleära celler})) \div (\text{Totala antalet celler})_T}{((\text{Antalet binukleära celler}) + (2 \times \text{Antalet multinukleära celler})) \div (\text{Totala antalet celler})_C} \times 100$$

T = behandlade odlingar
C = kontrollodlingar

2. Således betyder ett RI-värde på 53 % att, jämfört med antalet celler som har delat sig till binukleära och multinukleära celler i kontrollodlingen, endast 53 % av detta antal har delat sig i den behandlade odlingen, dvs. 47 % cystostas.

3. När *cytoB* inte används, rekommenderas att cytotoxiciteten utvärderas på grundval av relativ ökning av celltal (RICC) eller relativ populationsfördubbling (RPD) (58), eftersom den andel av cellpopulationen som har delat sig beaktas i båda metoderna.

$$\text{RICC} = \frac{(\text{Ökning av cellantal i behandlade odlingar (slutlig - vid start)})}{(\text{Ökning av cellantal i kontrollodlingar (slutlig - vid start)})} \times 100$$

$$\text{RPD} = \frac{(\text{Antal populationsfördubblingar i behandlade odlingar})}{(\text{Antal populationsfördubblingar i kontrollodlingar})} \times 100$$

där

$$\text{Populationsfördubbling} = [\log (\text{Cellantal efter behandling} \div \text{Ursprungligt cellantal})] \div \log 2$$

4. Således indikerar ett RICC-värde eller ett RPD-värde på 53 % att det förekommer 47 % cytotoxicitet/cystostas.

5. Genom att använda ett proliferationsindex (PI) kan cytotoxiciteten bestämmas genom att räkna antalet kloner som består av 1 cell (cl1), 2 celler (cl2), 3 till 4 celler (cl4) och 5 till 8 celler (cl8)

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

6. PI har använts som en värdefull och tillförlitlig cytotoxicitetsparameter även för cellinjer som har odlats *in situ* utan tillsats av *cytoB* (25) (26) (27) (28).

Tillägg 3

Referenskemikalier som rekommenderas för bedömning av prestanda ⁽¹⁾

Kategori	Kemikalie	CAS-nummer	EG-nummer
1. Klastogener utan metabolisk aktivering			
	Cytosinarabinosid	147-94-4	205-705-9
	Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
2. Klastogener som kräver metabolisk aktivering			
	Benso(a)pyren	50-32-8	200-028-5
	Cyklofosamid	50-18-0	200-015-4
3. Aneugener			
	Kolchicin	64-86-8	200-598-5
	Vinblastin	143-67-9	205-606-0
4. Negativa ämnen			
	Di(2-etylhexyl)ftalat	117-81-7	204-211-0
	Nalidixinsyra	389-08-2	206-864-7
	Pyren	129-00-0	204-927-3
	Natriumklorid	7647-14-5	231-598-3

⁽¹⁾ Referenskemikalierna är de kemikalier som rekommenderas. Ersättning eller tillägg av kemikalier till förteckningen över referenskemikalier kan göras om deras aktivitet är känd och de inducerar mikrokärnor enligt samma mekanismer, och om de kan påvisas vara relevanta för de kemikalier som ska testas med MNvit-förfarandet. Beroende på ändamålet kan motiveringen också innehålla en valideringsstudie där man använt ett brett urval olika ämnen eller fokuserat på ett smalare spektrum baserat på testämnets kemiska klass eller mekanismen för den skada som undersöks.

B.50. HUDSENSIBILISERING: LLNA-METODEN (LOCAL LYMPH NODE ASSAY): DA

INLEDNING

- OECD:s riktlinjer för testning av kemikalier (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals) och EU:s testmetoder ses regelbundet över med hänsyn till den vetenskapliga utvecklingen, nya lagstiftningsbehov och djurens välbefinnande. Den första testmetoden (B.42) för bestämning av hudsensibilisering hos möss (LLNA-metoden, OECD:s testriktlinje 429) har reviderats (1). Närmare uppgifter om valideringen av LLNA-metoden och en granskning av arbetet i samband med denna har offentliggjorts (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). I LLNA-metoden används radioisotopiskt tymidin eller jod för att mäta lymfocytproliferation och metoden har därför begränsad användning när det förekommer problem med att anskaffa, använda eller bortskaffa radioaktivitet. LLNA: DA (som utvecklats av Daicel Chemical Industries, Ltd) är en icke-radioaktiv modifiering av LLNA enligt vilken mängden adenosintrifosfat (ATP) kvantifieras genom bioluminescens som en indikator på lymfocytproliferation. LLNA: DA-testmetoden har validerats, granskats och rekommenderats av en internationell expertutvärderingspanel som konstaterade att den kan användas för att identifiera hudsensibiliserande och icke-hudsensibiliserande kemikalier, med vissa begränsningar (10)(11)(12)(13). Testmetoden är avsedd för bedömning av kemikaliers (ämnens och blandningars) potential att framkalla hudsensibilisering hos djur. Enligt kapitel B.6 i denna bilaga och i OECD:s testriktlinje 406 används test på marsvin, särskilt maximeringstest på marsvin och Buehler-test (14). LLNA (kapitel B.42 i denna bilaga, OECD:s testriktlinje 429) och de två icke-radioaktiva modifieringarna LLNA: DA (kapitel B.50 i denna bilaga, OECD:s testriktlinje 442 A) och LLNA: BrdU-ELISA (kapitel B.51 i denna bilaga, OECD:s testriktlinje 442 B) har fördelar jämfört med marsvinstestet enligt B.6 och OECD:s testriktlinje 406 (14) såtillvida att man kan minska antalet djur och använda dem på ett skonsammare sätt.
- I likhet med LLNA används LLNA: DA för att undersöka hudsensibiliseringens induktionsfas, vilket ger tillgång till kvantitativa data som är lämpliga för dos-responsbedömning. Vidare gäller att de här metodernas förmåga att detektera hudsensibiliserande kemikalier utan att det behövs radiomärkning för DNA eliminerar risken för yrkesmässig exponering för radioaktivitet och problem rörande bortskaffning av avfall. Detta kan i sin tur ge möjlighet till ökad användning av möss för att upptäcka hudsensibiliserande ämnen, vilket ytterligare kan minska användningen av marsvin för att testa kemikaliers hudsensibiliserande potential (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406) (14).

DEFINITIONER

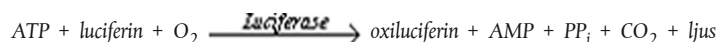
- Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

4. LLNA: DA är en modifierad LLNA-metod för identifiering av kemikalier med potential att framkalla hudsensibilisering, med specifika begränsningar. Detta betyder dock inte nödvändigtvis att LLNA: DA alltid ska användas i stället för LLNA eller test på marsvin (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406) (14), utan att metoden är likvärdig och kan användas som ett alternativ i fall där positiva och negativa resultat i regel inte kräver någon ytterligare bekräftelse (10) (11). Testningslaboratoriet bör analysera all tillgänglig information om testämnet innan själva testningen genomförs. Sådan information inbegriper ämnets identitet och kemiska struktur, fysikalisk-kemiska egenskaper, resultaten från andra eventuella *in vitro*- eller *in vivo*-test avseende testämnets toxicitet samt toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier. Denna information bör övervägas för att kunna fastställa om LLNA-metoden är lämplig för testämnet (mot bakgrund av att LLNA-metoden inte kan användas för vissa typer av kemikalier, se punkt 5) och som stöd för valet av dos.
5. LLNA: DA är en *in vivo*-metod, och därför kan man inte undvika användningen av djur för bedömning av sensibilisering genom allergisk kontakt. Detta test erbjuder dock möjligheter till att minska antalet djur i jämförelse med test på marsvin (B.6; OECD:s testriktlinje 406) (14). Dessutom ger LLNA: DA möjlighet till en betydligt skonsammare behandling (mindre smärta och lidande) av de djur som används för testning av sensibilisering genom allergisk kontakt, eftersom man med LLNA: DA, till skillnad från B.6 och OECD:s testriktlinje 406 inte behöver framkalla provokationsinducerade dermala hypersensitivetsreaktioner. Trots fördelarna med LLNA: DA i jämförelse med B.6 och OECD:s testriktlinje 406 (14), finns det vissa begränsningar som gör att man kanske måste använda B.6 eller OECD:s testriktlinje 406 (t.ex. testning av vissa metaller, falska positiva resultat med vissa hudirriterande ämnen (såsom vissa ytaktiva ämnen (6) (1 och kapitel B.42 i denna bilaga), testämnets löslighet)). Dessutom kan det för kemiska klasser eller ämnen som har funktionella grupper som påvisats agera som potentiella störfaktorer (16) vara nödvändigt att använda test på marsvin (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406 (14)). Det rekommenderas att de begränsningar som anges för LLNA (1 och kapitel B.42 i denna bilaga) även ska gälla för LLNA: DA (10). Dessutom är LLNA: DA eventuellt inte lämplig för testning av ämnen som påverkar ATP-nivåerna (t.ex. ämnen som fungerar som ATP-inhibitorer) eller ämnen som stör exakt mätning av intracellulärt ATP (t.ex. förekomsten av ATP-degraderande enzymer eller förekomst av extracellulärt ATP i lymfnoden). Utöver sådana identifierade begränsningar bör LLNA: DA gå att använda för testning av alla ämnen, utom om ett ämne förknippas med egenskaper som kan påverka LLNA: DA-metodens exakthet. Dessutom bör överväganden göras rörande risken för positiva gränsresultat när man får värden för stimulationsindex (SI) mellan 1,8 och 2,5 (se punkterna 31–32). Detta grundar sig på valideringsdatabasen med 44 ämnen med användning av SI $\geq 1,8$ (se punkt 6) för vilka LLNA: DA ger korrekt identifiering av alla 32 sensibiliserande ämnen enligt LLNA men felaktig identifiering av 3 av 12 icke-sensibiliserande ämnen enligt LLNA med SI-värden mellan 1,8 och 2,5 (dvs. på gränsen till positivt) (10). Eftersom samma datauppsättning användes för att fastställa SI-värdena och beräkna testmetodens förutsägande egenskaper kan dock de angivna resultaten vara en överuppskattning av de faktiska förutsägande egenskaperna.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

6. LLNA: DA bygger på principen om att sensibiliserande ämnen inducerar en primär proliferation av lymfocyter i de lymfnoder som dränerar det område där testämnet appliceras. Denna proliferation står i proportion till den applicerade dosen och det allergiframkallande ämnets styrka, och är ett enkelt sätt att få en kvantitativ mätning av sensibiliseringen. Proliferationen mäts genom att jämföra medelproliferationen i varje testgrupp med medelproliferationen i den vehikelbehandlade kontrollgruppen. Förhållandet mellan medelproliferationen i respektive behandlingsgrupp och den parallella vehikelkontrollgruppen, kallat stimulationsindex (SI), bestäms och detta bör vara $\geq 1,8$ för att det ska vara motiverat att klassificera testämnet som potentiellt hudsensibiliserande ämne. Det förfarande som beskrivs här grundar sig på mätning av ATP-innehållet (som korrelerar med antalet levande celler) genom bioluminescens (17) i syfte att indikera ett ökat antal prolifererande celler i de aurikulära dränerande lymfnoderna (18) (19). I bioluminescensmetoden används enzymet luciferas för att katalysera ombildningen till ljus från ATP och luciferin enligt följande reaktion:



Det emitterade ljusets intensitet är linjärt relaterat till ATP-koncentrationen och uppmäts med en luminometer. Luciferin-luciferas-förfarandet är en känslig metod för ATP-kvantifiering som används i en mängd olika tillämpningar (20).

TESTBESKRIVNING

Val av djurart

7. För detta test används mus. Valideringsstudier för LLNA: DA genomfördes uteslutande med stammen CBA/J som därför anses vara den stam som är att föredra (12) (13). I testet används unga vuxna mushonor som inte har fött ungar och som inte är dräktiga. När försöket inleds bör djuren vara 8–12 veckor gamla. Djurens viktvariation bör vara minimal och får inte överskrida 20 % av medelvikten. Övriga stammar eller hanar kan användas som alternativ förutsatt att det finns tillräckliga data som stöd för att det inte förekommer några betydande stam- eller könsberoende skillnader i LLNA: DA-respons.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

8. Mössen ska inhysas i grupper (21), utom om det finns tillbörlig vetenskaplig motivering för individuell inhysning. Temperaturen i djurens utrymme bör vara 22 ± 3 °C. Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målvärdet bör dock vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, och djuren bör ha obegränsad tillgång till dricksvatten.

Förberedelse av djuren

9. Djuren väljs ut slumpmässigt och förses med märkning så att de kan identifieras individuellt (örönmärkning får dock inte användas). Därefter får djuren akklimatisera sig till laboratoriets förhållanden i sina burar i minst fem dagar före doseringsstart. Innan behandlingen inleds undersöks alla djur för att säkerställa att de inte har några synliga hudskador.

Förberedelse av doseringslösningar

10. Kemikalier i fast form ska upplösas eller suspenderas i lösningsmedel/vehikel och vid behov spädas ut före appliceringen på mössens öron. Kemikalier i vätskeform kan appliceras i ren eller utspädd form. Olösliga kemikalier, av den typ som ofta används i medicintekniska produkter, ska före applicering på mössens öron extraheras kraftigt i lämpligt lösningsmedel för att få ut alla extraherbara beståndsdelar för testning. Testlösningarna ska beredas dagligen utom om stabilitetsdata visar att lagring kan accepteras.

Tillförlitlighetskontroll

11. Positiva kontrollkemikalier används för att påvisa att testsystemet klarar av att ge respons med tillräcklig och reproducerbar känslighet för ett sensibiliserande testämne för vilket responsen har en välkarakteriserad styrka. Användningen av en parallell positiv kontroll rekommenderas eftersom den påvisar laboratoriets kompetens att genomföra testningar på ett framgångsrikt sätt och ger möjlighet att bedöma reproducerbarhet och jämförbarhet inom laboratoriet och mellan laboratorier. Vissa tillsynsmyndigheter kräver också att positiv kontroll används för varje försök, och därför rekommenderas samråd med relevanta myndigheter innan testning med LLNA: DA inleds. Likaså uppmuntras rutinanvändning av parallell positiv kontroll för att undvika tilläggstestning på djur i fall där myndigheterna inte godkänner periodiska positiva kontroller (se punkt 12). Den positiva kontrollen bör ge en positiv LLNA: DA-respons på den exponeringsnivå som förväntas ge en ökning av stimulationsindex (SI) som är större eller lika med 1,8 i förhållande till den negativa kontrollgruppen. Dosen för den positiva kontrollkemikalien ska väljas så att den inte orsakar särskilt kraftig hudirritation eller systemisk toxicitet och att induktionen är reproducerbar men inte för kraftig (t.ex. $SI > 10$ anses vara för högt värde). Rekommenderade ämnen för positiv kontroll är 25-procentig hexylkanelaldehyd (CAS-nummer 101-86-0) och 25-procentig eugenol (CAS-nummer 97-53-0) i acetone-olivoljeblandning i förhållandet 4:1 (volym/volym). I vissa fall kan även andra positiva kontrollkemikalier som uppfyller de ovan angivna kriterierna användas, förutsatt att tillbörlig motivering kan ges.
12. Även om användning av en parallell positiv kontrollgrupp rekommenderas kan det finnas betingelser där det är tillräckligt med periodisk testning (dvs. minst var sjätte månad) av den positiva kontrollen i laboratorier som regelbundet genomför LLNA: DA (dvs. minst en gång i månaden) och som har en etablerad historisk databas över positiv kontroll som påvisar laboratoriets förmåga att få reproducerbara och exakta resultat från positiva kontroller. Tillräcklig kvalitet hos LLNA: DA kan framgångsrikt påvisas genom att enhetliga positiva resultat erhålls från den positiva kontrollen vid minst tio oberoende testningar som genomförs inom en skälig tidsperiod (kortare än ett år).
13. Parallell positiv kontrollgrupp ska alltid användas när det sker ändringar rörande testningsförfarandet (t.ex. ny personal, nya material och/eller reagenser, annorlunda utrustning, byte av testdjurens ursprung), och sådana ändringar bör dokumenteras i laboratorierapporter. Man bör överväga om dessa ändringar påverkar den tidigare etablerade historiska databasens lämplighet, för att kunna avgöra om det behövs en ny historisk databas för dokumentering av den positiva kontrollens resultatenhetlighet.
14. Man bör vara medveten om att beslut om att använda positiva kontroller med vissa intervaller i stället för parallellt har återverkningar på lämpligheten och godtagbarheten hos negativa undersökningens resultat som fås utan parallell positiv kontroll under den tid som löper mellan de periodiska undersökningarna av positiv kontroll. Om t.ex. falska negativa resultat fås vid ett periodiskt test av positiv kontroll, måste man kanske ifrågasätta resultat som erhållits mellan det sista godtagbara periodiska testet av positiv kontroll och ett icke-godtagbart periodiskt test med positiv kontroll. Följderna av dessa utfall bör övervägas noggrant när man avgör huruvida parallella positiva kontroller ska användas eller om de positiva kontrollerna enbart ska vara periodiska. Likaså bör man överväga användning av färre djur i den parallella positiva kontrollgruppen när detta är vetenskapligt motiverat och laboratoriet med stöd av laboratoriespecifika historiska data kan påvisa att färre möss kan användas (22).

15. Även om det positiva kontrollämnet bör testas i en vehikel som veterligen framkallar en enhetlig respons (t.ex. aceton-olivoljeblandning i förhållandet 4:1 (volym/volym)), kan det förekomma vissa föreskriftsreglerade situationer där det även behövs testning i en icke-standardmässig vehikel (kliniskt och kemiskt relevant formulering) (23). Om det parallella positiva kontrollämnet testas i en annan vehikel än den som används för testämnet, bör en separat kontrollgrupp användas för den parallella positiva kontrollen.
16. I fall där utvärdering görs av testämnen av en viss kemisk klass eller med en viss responskala kan det också vara värdefullt med referensämnen för att påvisa att testmetoden fungerar tillfredsställande för bestämning av hudsensibiliseringspotentialen hos dessa typer av ämnen. Ett lämpligt referensämne ska ha följande egenskaper:
- Strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas.
 - Kända fysikalisk-kemiska egenskaper.
 - Stödande data från LLNA: DA.
 - Stödande data från andra djurmodeller och/eller från människor.

TESTFÖRFARANDE

Antalet djur och dosnivåer

17. Minst fyra djur per dosgrupp och minst tre koncentrationer av testämnet bör användas. Dessutom används en parallell negativ kontrollgrupp som endast behandlas med samma vehikel som används för testämnet och en positiv kontroll (parallell eller nyligen gjord, enligt laboratoriets principer för överväganden enligt punkterna 11–15). Man bör överväga flera upprepade doser av det positiva kontrollämnet, särskilt när den positiva kontrollen testas periodiskt. Med undantag för behandling med testämnet bör djuren i kontrollgrupperna hanteras på exakt samma sätt som djuren i dosgrupperna.
18. Doserna och vehikeln bör väljas på grundval av rekommendationerna i hänvisningarna 0 och (24). Doserna väljs i regel enligt en lämplig koncentrationsserie såsom 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, osv. Valet av koncentrationsserie ska ges tillbörlig vetenskaplig motivering. All existerande tillgänglig och relevant toxikologisk information (t.ex. akut toxicitet och hudirritation) samt strukturell och fysikalisk-kemisk information om testämnet (och/eller strukturellt besläktade ämnen) bör övervägas vid valet av de tre på varandra följande koncentrationerna så att den högsta koncentrationen ger maximal exponering samtidigt som systemisk toxicitet och särskilt kraftig lokal hudirritation undviks (24) (25). Om sådan information inte finns kan det vara nödvändigt att först genomföra ett preliminärt screeningtest (se punkterna 21–24).
19. Vehikeln får inte störa eller snedvrider testresultaten och ska väljas med tanke på största möjliga löslighet för att få högsta möjliga koncentration samtidigt som man får en lösning/suspension som är lämplig för applicering av testämnet. Som vehikel rekommenderas aceton-olivoljeblandning (4:1 volym/volym), *N,N*-dimetylformamid, metyletylketon, propylenglykol och dimetylsulfoxid (6) men även andra vehiklar kan användas förutsatt att tillräcklig vetenskaplig motivering kan ges. I vissa situationer kan det vara nödvändigt att som extra kontroll använda ett kliniskt relevant lösningsmedel eller en kommersiellt tillgänglig blandning där testämnet ingår. Särskild vikt bör fästas vid att säkerställa att hydrofila ämnen inkorporeras i ett vehikelsystem som väter huden och som inte omedelbart rinner bort, genom att använda lämpliga solubilisering ämnen (t.ex. 1-procentig Pluronic® L92). Det betyder att helt vattenbaserade vehiklar bör undvikas.
20. Genom analys av lymfnoder från individuella möss kan man bestämma variationer djuren emellan och göra en statistisk jämförelse av skillnaden mellan mätningar för testämnet och mätningarna i kontrollgruppen (se punkt 33). Dessutom kan möjligheten att minska antalet möss i den positiva kontrollgruppen endast övervägas utifrån att data samlas in individuellt per djur (22). Vidare gäller att vissa tillsynsmyndigheter kräver att data insamlas per individuellt djur. Regelbunden insamling av individuella data per djur ger en fördel rörande djurens välbefinnande eftersom man kan undvika upprepade testning som annars skulle behövas om testämnesresultat som ursprungligen har samlats in på ett visst sätt (t.ex. genom poolade djurdata) måste granskas senare av tillsynsmyndigheter som har avvikande krav (såsom data per individuellt djur).

Preliminärt screeningtest

21. Om det inte finns tillgång till information för att bestämma högsta testdosen (se punkt 18) bör ett preliminärt screeningtest genomföras för att definiera den lämpliga dosnivån för test i LLNA: DA. Syftet med det preliminära screeningtestet är att ge vägledning för valet av högsta dosnivå som ska användas i den huvudsakliga LLNA: DA-undersökningen i fall där det inte finns tillgång till information om vilken koncentration som inducerar systemisk toxicitet (se punkt 24) och/eller särskilt kraftig lokal hudirritation (se punkt 23). Den högsta dosnivå som testas ska vara 100 % testämne för vätskor eller högsta möjliga koncentration för fasta ämnen eller suspensioner.

22. Det preliminära screeningtestet genomförs under identiska betingelser som vid den huvudsakliga LLNA: DA-undersökningen, utom att man inte utvärderar proliferationen i lymfnoderna och man kan använda färre djur i dosgruppen. Ett eller två djur per dosgrupp föreslås. Alla möss observeras dagligen för kliniska tecken på systemisk toxicitet eller lokal irritation på appliceringsstället. Djurens kroppsvikt registreras före testningen och efter avslutad testning (dag 8). På varje mus observeras båda öronen i fråga om hudrodnad och graderas enligt tabell 1 (25). Mätning av örontjocklek görs t.ex. med digital mikrometer eller Peacock Dial-instrument på dag 1 (före dosering), dag 3 (cirka 48 timmar efter den första dosen), dag 7 (24 timmar före avslut) och dag 8. Dessutom kan örontjockleken bestämmas på dag 8 genom vägning av en öronbit som stansats ut efter att djuren har avlivats skonsamt. Särskilt kraftig lokal hudirritation indikeras genom hudrodnadsgradering ≥ 3 och/eller ökning av örontjockleken med $\geq 25\%$ på någon av mätningdagarna (26) (27). Den högsta dos som väljs för den huvudsakliga LLNA: DA-undersökningen blir nästa lägre dos i koncentrationsserien för den preliminära screeningen (se punkt 18) som inte inducerar systemisk toxicitet och/eller särskilt kraftig hudirritation.

Tabell 1

Grader av hudrodnad

Observation	Gradering
Ingen hudrodnad	0
Mycket svag rodnad (knappt skönjbar)	1
Väldefinierad hudrodnad	2
Moderat till svår hudrodnad	3
Svår hudrodnad (köttrodnad) till sårskorpebildning som utgör hinder för gradering av rodnaden	4

23. Utöver en 25-procentig ökning av örontjocklek (26) (27) har en statistiskt signifikant ökning av örontjockleken hos behandlingsgruppens möss i jämförelse med kontrollgruppens möss också använts för att identifiera irriterande ämnen genom LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Dock så gäller att även om statistiskt signifikanta öknningar kan inträffa när ökningen av örontjocklek är mindre än 25 %, har dessa inte specifikt förknippats med särskilt kraftig irritation (30) (31) (32) (33) (34).
24. Följande kliniska observationer kan indikera systemisk toxicitet (35) när de används som del av en helhetsbedömning, och kan därför ge hänvisning om den högsta dosnivå som ska användas i det huvudsakliga LLNA: DA-försöket: ändringar av nervsystemets funktion (t.ex. upprett päls, ataxi, skälvnningar och konvulsioner), ändringar av beteende (t.ex. aggressivitet, ändringar av putsningsbeteende, markerad ändring av aktivitetsnivå), ändringar av andningsmönster (dvs. ändringar av andningens frekvens och intensitet, såsom dyspné, gäspande och rassel) samt ändringar av födo- och vattenintag. Vid utvärderingen ska man också beakta tecken på letargi och/eller avsaknad av reaktioner, alla slags kliniska tecken på mer än lätt eller momentan smärta eller lidande, en minskning på mer än 5 % av kroppsvikten från dag 1 till dag 8 samt mortalitet. Döende djur och djur som visar tecken på svår smärta och lidande ska avlivas skonsamt (36).

Huvudundersökningens försöksschema

25. För testet används följande försöksschema:

- *Dag 1:* Djuren märks individuellt och vikten samt eventuella kliniska observationer registreras. Applicera en 1-procentig vattenlösning av natriumlaurylsulfat (SLS) på baksidan av varje öra med en borste doppad i lösningen och täck örats hela baksida med fyra till fem strykningar. En timme efter SLS-behandlingen appliceras 25 µl lämpligt utspätt testämne, enbart vehikel eller positivt kontrollämne (parallell eller nyligen gjord positiv kontroll, i enlighet med laboratoriets principer rörande punkterna 11–15) på båda öronens baksida.
- *Dagarna 2, 3 och 7:* Upprepa förbehandlingen med 1-procentig SLS-vattenlösning och applicera testämnet på samma sätt som på dag 1.
- *Dagarna 4, 5 och 6:* Ingen behandling.
- *Dag 8:* Registrera vikten för varje djur och eventuella kliniska observationer. Avliva djuren skonsamt cirka 24–30 timmar efter appliceringsstarten dag 7. Skär bort de aurikulära dränerande lymfnoderna från varje musöra och behandla separat i fosfatbuffrad saltlösning (PBS) för varje djur. Närmare uppgifter och scheman för identifiering och dissekering av noder finns i hänvisning (22). För ytterligare kontroll av lokal hudresponns i huvudundersökningen kan tilläggsparametrar såsom gradering av örats hudrodnad eller mätningar av örats tjocklek (med tjocklekmätare eller genom vägning av utstansad bit vid obduceringen) införlivas i undersökningsprotokollet.

Beredning av cellsuspensioner

26. För varje mus bereds en suspension med enskilda celler av de bilateralt bortskurna lymfnodscellerna (LNC) genom att placera lymfnoderna mellan två objektglas som trycks lätt samman för att krossa noderna. Kontrollera att vävnaden har spritt ut sig i ett tunt skikt och dra isär de två objektglasen. Bered en suspension av vävnaden på båda objektglasen genom att hålla dem ett i sänder i vinkel över en Petriskål och skölja med fosfatbuffrad saltlösning och skrapa samtidigt loss vävnaden med en cellskrapa. Observera att lymfnoderna i den negativa kontrollgruppens djur är små, och det är viktigt att iaktta stor försiktighet för att inte åstadkomma störande inverkan på SI-värdena. Totalt används 1 ml fosfatbuffrad saltlösning för sköljning av båda objektglasen. Gör en lätt homogenisering av LNC-suspensionen i Petriskålen med hjälp av cellskrapan. Dra upp en alikvot på 20 µl ur LNC-suspensionen med mikropipett och var försiktig med att inte ta upp membran som kan ses med blotta ögat, och blanda sedan med 1,98 ml fosfatbuffrad saltlösning till en provvolym på 2 ml. Bered sedan ett andra prov på 2 ml genom samma förfarande så att det finns två prov beredda per djur.

Bestämning av cellproliferation (mätning av lymfocyternas ATP-innehåll)

27. Ökning av ATP-innehållet i lymfnoderna mäts genom luciferin-luciferas-metoden med användning av ett system för ATP-mätning som mäter bioluminiscensen som relativa ljusenheter (Relative Luminescence Units, RLU). Tiden mellan avlivning av ett djur fram till mätning av ATP-innehållet bör vara enhetlig, inom cirka 30 minuter, eftersom man anser att ATP-innehållet gradvis minskar med tiden efter avlivningen (12). Serien av förfaranden från bortskärning av de aurikulära lymfnoderna fram till ATP-mätning bör därför slutföras inom 20 minuter enligt det på förhand fastställda tidsschemat som är samma för varje djur. ATP-luminiscensen bör mätas för varje 2 ml-prov så att totalt två ATP-mätningar görs per djur. Genomsnittet för ATP-luminiscens bestäms och används därefter för beräkningarna (se punkt 30).

OBSERVATIONER**Kliniska observationer**

28. Varje mus bör observeras minst dagligen med tanke på eventuella kliniska tecken – lokal irritation vid appliceringsstället eller tecken på systemisk toxicitet. Alla observationer registreras systematiskt och individuellt per mus. Övervakningsplanerna bör inbegripa kriterier för omedelbar identifiering av möss som visar tecken på systemisk toxicitet, särskilt kraftig hudirritation eller hudkorrosion, så att de kan avlivas (36).

Kroppsvikt

29. Såsom konstateras i punkt 25 ska de individuella djurens vikt registreras vid försökets början och strax före den schemalagda avlivningen.

BERÄKNING AV RESULTATEN

30. Resultaten för varje behandlingsgrupp uttrycks som genomsnittet för stimulationsindex. Stimulationsindex erhålls genom att genomsnittligt värde för RLU/djur inom varje testämnesgrupp och den positiva kontrollgruppen divideras med genomsnittligt värde för RLU/djur för kontrollgruppen för lösningsmedel/vehikel. Genomsnittligt stimulationsindex för vehikelkontrollgrupperna är då 1.
31. Vid bedömning av resultaten anses ett resultat vara positivt när $SI \geq 1,8$ (10). Man kan dock även använda dos-responsförhållandets styrka samt den statistiska signifikansen och enhetligheten hos responsen i kontrollgruppen för lösningsmedel/vehikel och i den positiva kontrollen när man fastställer huruvida ett gränslösresultat (dvs. SI-värde mellan 1,8 och 2,5) ska anses vara positivt 0 0 (37).
32. För ett gränslösresultat för positiv respons där SI-värdet ligger mellan 1,8 och 2,5 vill man kanske beakta tilläggsinformation såsom dos-responsförhållandet, tecken på systemisk toxicitet eller särskilt kraftig irritation och, där det är lämpligt, statistisk signifikans tillsammans med SI-värden för att bekräfta att resultaten är positiva (10). Likaså bör man beakta testämnets olika egenskaper, inbegripet eventuell strukturell släktskap med kända hudsensibiliserande ämnen, huruvida ämnet orsakar särskilt kraftig hudirritation hos mössen samt naturen hos det iakttagna förhållandet mellan dos och respons. Dessa och andra aspekter diskuteras närmare i andra källor (4).
33. När data samlas in per enskild mus kan man göra en statistisk analys rörande förekomsten av dosrespons och graden för dos-responsförhållande. Alla statistiska analyser kan inbegripa en utvärdering av dos-responsförhållandet och en lämpligt anpassad jämförelse mellan testgrupper (t.ex. parvisa jämförelser mellan doseringsgrupp och parallell kontrollgrupp för lösningsmedel/vehikel). De statistiska analyserna kan inbegripa t.ex. linjär regression eller Williams test för utvärdering av dos-responstrender och Dunnetts test för parvisa jämförelser. Vid valet av en lämplig metod för den statistiska analysen bör man vara medveten om eventuella olikheter hos varianterna och andra relaterade problem som kan göra det nödvändigt att göra en datatransformation eller en icke-parametrisk statistisk analys. Det kan också vara nödvändigt att genomföra beräkningar av stimulationsindex och statistiska analyser med och utan vissa datapunkter (s.k. outliers – utanföriggande värden).

DATA OCH RAPPORTERING

Data

34. Data sammanställs i tabellform med angivelse av RLU-värden per djur, gruppens medelvärde för RLU per djur, den associerade feltermen (t.ex. SD, SEM) och medelvärdet för stimulationsindex för varje dosgrupp jämfört med den parallella kontrollgruppen för lösningsmedel/vehikel.

Testrapport

35. Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

Test- och kontrollkemikalier

- Identifieringsdata (t.ex. CAS-nummer och EG-nummer, om tillgängligt, källa, renhet, kända orenheter, satsnummer).
- Fysikalisk natur och fysikalisk-kemiska egenskaper (t.ex. flyktighet, stabilitet, löslighet).
- För blandningar anges sammansättning och beståndsdelarnas relativa procentandelar.

Lösningsmedel/vehikel

- Identifieringsdata (renhet, koncentration (om tillämpligt), volym som har använts).
- Motivering för val av vehikel.

Testdjur

- CBA-mössens ursprung.
- Mikrobiologiska data för djuren, om dessa data är kända.
- Antal djur och deras ålder.
- Ursprung, inhysningsförhållanden, foder och dylikt.

Testbetingelser

- Ursprung, satsnummer och tillverkarens kvalitetsintyg/kvalitetskontrolldata för ATP-kit.
- Detaljerade uppgifter om beredning och applicering av testämnet.
- Motivering för valet av dos (även resultat från preliminär screening om sådan har genomförts).
- Koncentrationerna för vehikel och testämne samt totala mängden testämne som applicerats.
- Detaljerade uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet diettyp/källa, vattenkälla).
- Detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman.
- Metoder för mätningar av toxicitet.
- Kriterier för att fastställa om resultatet är positivt eller negativt.
- Uppgifter rörande eventuella avvikelser från protokollet och redogörelse för hur avvikelsen påverkar undersökningens utformning och resultat.

Tillförlitlighetskontroll

- Sammanfattning av resultaten från senaste tillförlitlighetskontroll, även information om testämne, koncentration och vehikel.

- Data från parallella och/eller historiska positiva kontroller och parallella negativa kontroller (lösningsmedel/vehykel) för testningslaboratoriet.
- Om försöket inte har omfattat parallell positiv kontroll, ange datum och laboratorierapport för senaste periodiska positiva kontroll och en rapport med uppgifter om laboratoriets historiska data för positiva kontroller som motivering för varför parallell positiv kontroll inte har använts.

Resultat

- Mössens individuella vikt vid doseringsstart och vid schemalagd avlivning samt medelvärde och associerad felterm (t.ex. SD, SEM) för varje behandlingsgrupp.
- Tidpunkten för första upptäckt av tecken på toxicitet, även eventuell hudirritation vid appliceringsstället, för varje försöksdjur.
- Tidpunkten för avlivning och tidpunkten för ATP-mätning per djur.
- En tabell med RLU-värden och SI-värden per djur för varje dosbehandlingsgrupp.
- Medelvärde och associerad felterm (t.ex. SD, SEM) för RLU per mus för varje behandlingsgrupp och resultaten från analys av utanföriggande värden för varje behandlingsgrupp.
- Beräknat stimulationsindex och ett lämpligt mått på variabilitet som beaktar variationen mellan djuren i testämnesgruppen och kontrollgruppen.
- Förhållandet mellan dos och respons.
- Statistisk analys, om tillämpligt.

Diskussion om resultaten

- En kort kommentar om resultaten, dos-responsanalys och statistiska analyser (i tillämpliga fall), med en slutsats om huruvida testämnet ska anses vara hudsensibiliserande.

HÄNVISNINGAR

- (1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Finns på: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- (2) Chamberlain, M. och 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. och 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. och 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. och 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. Finns på: 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. Finns på: <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. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRRept2009.pdf.
- (12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. och 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. och 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. Finns på: <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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf
- (23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71–89.
- (24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. och 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. Finns på: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

- (26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. och 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. Finns på: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>
- (28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. och 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. och 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. och 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. och 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. och Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721–728.
- (34) Patterson, R.M., Noga, E. och 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. Finns på: 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. Finns på: <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. och 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.
- (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. Finns på: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

Tillägg 1

DEFINITIONER

Exakthet: Mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Exakthet är ett mått på testmetodens prestanda och en relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med 'konkordans' för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (38).

Referensämne: Sensibiliserande eller icke-sensibiliserande ämne som används som standard för jämförelse med ett testämne. Ett referensämne ska ha följande egenskaper: i) en eller flera enhetliga och tillförlitliga källor, ii) strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas, iii) kända fysikalisk-kemiska egenskaper, iv) stödande data om kända effekter och v) känd styrka inom det önskade responsområdet.

Falsk negativt: Ett ämne som felaktigt har identifierats som negativt eller icke-aktivt genom en testmetod när ämnet i själva verket är positivt eller aktivt.

Falskt positivt: Ett ämne som felaktigt har identifierats som positivt eller aktivt genom en testmetod när ämnet i själva verket är negativt eller icke-aktivt.

Fara: Potentialen för skadliga verkningar på hälsa eller miljö. De skadliga verkningarna visar sig enbart om exponeringsnivån är tillräcklig.

Reproducerbarhet mellan laboratorier: Ett mått på i hur stor utsträckning olika kvalificerade laboratorier kan producera kvalitativt och kvantitativt liknande resultat, med användning av samma protokoll och samma testämnen. Reproducerbarheten mellan laboratorier fastställs under förvalideringen och valideringen och den indikerar i hur stor utsträckning ett test framgångsrikt kan överföras mellan laboratorier (38).

Reproducerbarhet inom laboratoriet: Ett mått på i vilken utsträckning kvalificerade personer inom samma laboratorium framgångsrikt kan upprepa resultat vid olika tidpunkter när de använder ett visst protokoll.

Utanförliggande värde: Ett utanförliggande värde ('outlier') är en observation som markant skiljer sig från de övriga värdena i ett slumpmässigt urval från en population.

Kvalitetssäkring: En styrningsprocess där personer som är i oberoende ställning i förhållande till de personer som genomför testningen bedömer hur standarder, krav och registreringsförfaranden för laboratorietestning följs och hur exakt data förmedlas.

Tillförlitlighet: Ett mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när metoden utförs med samma protokoll. Den bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier (38).

Hudsensibilisering: En immunologisk process som följer av att en mottaglig individ exponeras ytvägen för en inducerande kemisk allergen som provocerar en kutan immunrespons som kan leda till att det uppstår kontaktsensibilisering.

Stimulationsindex (SI): Ett värde som beräknas för att bedöma hudsensibiliseringspotentialen hos ett testämne och som är förhållandet mellan proliferationen i behandlingsgrupperna och proliferationen i den parallella vehikelkontrollgruppen.

Testämne (kallas också testkemikalie): Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

B.51. HUDSENSIBILISERING: LLNA-METODEN (LOCAL LYMPH NODE ASSAY): BrdU-ELISA

INLEDNING

1. OECD:s riktlinjer för testning av kemikalier (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals) och EU:s testmetoder ses regelbundet över med hänsyn till den vetenskapliga utvecklingen, nya lagstiftningsbehov och djurens välbefinnande. Den första testmetoden (B.42) för bestämning av hudsensibilisering hos möss (LLNA-metoden, OECD:s testriktlinje 429) har reviderats (1 och kapitel B.42 i denna bilaga). Närmare uppgifter om valideringen av LLNA och en översikt av arbetet i samband med denna har offentliggjorts (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). I LLNA-metoden används radioisotopiskt tyminin eller jod för att mäta lymfocytproliferation och metoden har därför begränsad användning när det förekommer problem med att anskaffa, använda eller bortskafta radioaktivitet. LLNA: BrdU-ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) är en icke-radioaktiv modifikation av LLNA-testmetoden och i den används icke-radiomärkt 5-bromo-2-deoxiuridin (BrdU) (CAS-nummer 59-14-3) i ett ELISA-baserat testsystem för mätning av lymfocytproliferation. LLNA: BrdU-ELISA har validerats, granskats och rekommenderats av en internationell oberoende expertutvärderingspanel som konstaterade att den kan användas för att identifiera hudsensibiliserande och icke-hudsensibiliserande kemikalier, med vissa begränsningar (10) (11) (12). Testmetoden är avsedd för bedömning av kemikaliers (ämnens och blandningars) potential att framkalla hudsensibilisering hos djur. Enligt kapitel B.6 i denna bilaga och i OECD:s testriktlinje 406 används test på marsvin, särskilt maximeringstest på marsvin och Buehler-test (13). LLNA (kapitel B.42 i denna bilaga; OECD:s testriktlinje 429) och de två icke-radioaktiva modifieringarna LLNA: BrdU-ELISA (kapitel B.51 i denna bilaga; OECD:s testriktlinje 442 B) och LLNA: DA (kapitel B.50 i denna bilaga; OECD:s testriktlinje 442 A) ger fördelar jämfört med marsvinstest enligt B.6 och OECD:s testriktlinje 406 (13) genom möjligheten att minska antalet djur och behandla dem på ett skonsammare sätt.

2. I likhet med LLNA används LLNA: BrdU-ELISA för att undersöka hudsensibiliseringens induktionsfas, vilket ger tillgång till kvantitativa data som är lämpliga för dos-responsbedömning. Vidare gäller att de här metodernas förmåga att upptäcka hudsensibiliserande kemikalier utan att det behövs radiomärkning för DNA eliminerar risken för yrkesmässig exponering för radioaktivitet och problem rörande bortskaffning av avfall. Detta kan i sin tur ge möjlighet till ökad användning av möss för att upptäcka hudsensibiliserande ämnen, vilket ytterligare kan minska användningen av marsvin för att testa kemikaliers hudsensibiliserande potential (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406) (13).

DEFINITIONER

3. Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

4. LLNA: BrdU-ELISA är en modifierad LLNA-metod för identifiering av kemikalier med potential att framkalla hudsensibilisering, med specifika begränsningar. Detta betyder dock inte nödvändigtvis att LLNA: BrdU-ELISA alltid ska användas i stället för LLNA eller test på marsvin (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406) (13), utan att metoden är likvärdig och kan användas som ett alternativ i fall där positiva och negativa resultat i regel inte kräver någon ytterligare bekräftelse (10) (11). Testningslaboratoriet bör analysera all tillgänglig information om testämnet innan själva testningen genomförs. Sådan information inbegriper ämnets identitet och kemiska struktur, fysikalisk-kemiska egenskaper, resultaten från andra eventuella *in vitro*- eller *in vivo*-test avseende toxicitet samt toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier. Denna information bör övervägas för att kunna fastställa om LLNA: BrdU-ELISA-metoden är lämplig för testämnet (mot bakgrund av att metoden inte kan användas för vissa typer av kemikalier, se punkt 5) och som stöd för valet av dos.
5. LLNA: BrdU-ELISA är en *in vivo*-metod, och därför kan man inte undvika användningen av djur för bedömning av sensibilisering genom allergisk kontakt. Metoden ger dock möjligheter att använda färre djur för detta ändamål i jämförelse med test på marsvin (B.6; OECD:s testriktlinje 406) (13). Dessutom ger LLNA: BrdU-ELISA möjlighet till en betydligt skonsammare behandling av djuren för testning av sensibilisering genom allergisk kontakt, eftersom man med LLNA: BrdU-ELISA, till skillnad från B.6 och OECD:s testriktlinje 406, inte behöver framkalla provokationsinducerade dermala hypersensitivetsreaktioner. Dessutom behöver adjuvant inte användas, vilket är fallet vid maximeringstest på marsvin (kapitel B.6 i denna bilaga, 13). LLNA: BrdU-ELISA är därför en mindre plågsam metod för djuren. Trots fördelarna med LLNA: BrdU-ELISA i jämförelse med B.6 och OECD:s testriktlinje 406 (13) finns det vissa begränsningar som gör att man kanske måste använda B.6 eller OECD:s testriktlinje 406 (t.ex. testning av vissa metaller, falska positiva resultat med vissa hudirriterande ämnen (såsom vissa ytaktiva ämnen) (6) (1 och kapitel B.42 i denna bilaga), testämnets löslighet)). Dessutom kan det för kemiska klasser eller ämnen som har funktionella grupper som påvisats agera som potentiella störfaktorer (15) vara nödvändigt att använda test på marsvin (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406 (13)). Det rekommenderas att de begränsningar som anges för LLNA (1 och kapitel B.42 i denna bilaga) även ska gälla för LLNA: BrdU-ELISA (10). Utöver sådana identifierade begränsningar bör LLNA: BrdU-ELISA gå att använda för testning av alla kemikalier, utom om en kemikalie förknippas med egenskaper som kan påverka LLNA: BrdU-ELISA-metodens exakthet. Dessutom bör överväganden göras rörande möjligheten till positiva gränsresultat, när man erhåller värden för stimulationsindex mellan 1,6 och 1,9 (se punkterna 31–32). Detta grundar sig på valideringsdatabasen med 43 ämnen och användning av $SI \geq 1,6$ (se punkt 6) för vilka LLNA: BrdU-ELISA ger korrekt identifiering av alla 32 sensibiliserande ämnen enligt LLNA men felaktig identifiering av 2 av 11 icke-sensibiliserande ämnen enligt LLNA med SI -värden mellan 1,6 och 1,9 (dvs. på gränsen till positivt) (10). Eftersom samma datauppsättning användes för att fastställa SI -värdena och beräkna testmetodens förutsägande egenskaper kan dock de angivna resultaten vara en överuppskattning av de faktiska förutsägande egenskaperna.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

6. LLNA: BrdU-ELISA bygger på principen om att sensibiliserande ämnen inducerar en primär proliferation av lymfocyter i de lymfnoder som dränerar det område där testämnet appliceras. Denna proliferation står i proportion till den applicerade dosen och det allergiframkallande ämnets styrka, och är ett enkelt sätt att få en kvantitativ mätning av sensibiliseringen. Proliferationen mäts genom att jämföra medelproliferationen i varje testgrupp med medelproliferationen i den vehikelbehandlade kontrollgruppen. Förhållandet mellan medelproliferationen i respektive behandlingsgrupp och den parallella vehikelkontrollgruppen, kallat stimulationsindex (SI), bestäms och detta bör vara $\geq 1,6$ för att det ska vara motiverat att klassificera testämnet som potentiellt hudsensibiliserande ämne. De förfaranden som beskrivs här grundar sig på mätning av BrdU-innehållet för att indikera ett ökat antal prolifererande celler i de aurikulära dränerande lymfnoderna. BrdU är ett analogt ämne med tymidin och inkorporeras på liknande sätt in i DNA i prolifererande celler. Inkorporeringen av BrdU mäts med ELISA med hjälp av en antikropp som är specifik för BrdU som också märks med peroxidas. När substratet tillsätts reagerar peroxidas med detta och det uppstår en färgad produkt som kvantifieras vid en specifik absorptions genom avläsning av en mikrotiterplatta.

TESTBESKRIVNING**Val av djurart**

7. För detta test används mus. Valideringsstudier för LLNA: BrdU-ELISA genomfördes uteslutande med stammen CBA/JN som därför anses vara den stam som är att föredra (10) (12). I testet används unga vuxna mushonor som inte har fött ungar och som inte är dräktiga. När försöket inleds bör djuren vara 8–12 veckor gamla. Djurens viktvariation bör vara minimal och får inte överskrida 20 % av medelvikten. Övriga stammar eller hanar kan användas som alternativ förutsatt att det finns tillräckliga data som stöd för att det inte förekommer några betydande stam- eller könsberoende skillnader i LLNA: BrdU-ELISA-respons.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

8. Mössen ska inhysas i grupper (16), utom om det finns tillbörlig vetenskaplig motivering för individuell inhysning. Temperaturen i testdjurens utrymme bör vara 22 ± 3 °C. Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målvärdet bör dock vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, och djuren bör ha obegränsad tillgång till dricksvatten.

Förberedelse av djuren

9. Djuren väljs ut slumpmässigt och förses med märkning så att de kan identifieras individuellt (öronmärkning får dock inte användas). Därefter får djuren aklimatisera sig till laboratoriets förhållanden i sina burar i minst fem dagar före doseringsstart. Innan behandlingen inleds undersöks alla djur för att säkerställa att de inte har några synliga hudskador.

Förberedelse av doseringslösningar

10. Kemikalier i fast form ska upplösas eller suspenderas i lösningsmedel/vehikel och vid behov spädas ut före appliceringen på mössens öron. Kemikalier i vätskeform kan appliceras i ren eller utspädd form. Olösliga kemikalier, av den typ som ofta används i medicintekniska produkter, ska extraheras kraftigt i lämpligt lösningsmedel så att alla extraherbara beståndsdelar för testning fås ut. Testlösningarna ska beredas dagligen utom om stabilitetsdata visar att lagring kan accepteras.

Tillförlitlighetskontroll

11. Positiva kontrollkemikalier används för att påvisa att testsystemet har tillräcklig och reproducerbar känslighet för ett sensibiliserande testämne och en respons med välkarakteriserad styrka. Användningen av en parallell positiv kontroll rekommenderas eftersom den påvisar laboratoriets kompetens att genomföra testningar på ett framgångsrikt sätt och ger möjlighet till bedömning av reproducerbarhet och jämförbarhet inom laboratoriet och mellan laboratorier. Vissa tillsynsmyndigheter kräver också att positiv kontroll används för varje undersökning, och därför uppmantras laboratorierna att samråda med relevanta myndigheter innan testning med LLNA: BrdU-ELISA inleds. Likaså uppmantras rutinanvändning av parallell positiv kontroll för att undvika tilläggstestning på djur för att uppfylla krav som kan uppstå från användningen av periodisk positiv kontroll (se punkt 12). Den positiva kontrollen bör ge en positiv LLNA: BrdU-ELISA-respons på den exponeringsnivå som förväntas ge en ökning av stimulationsindex (SI) som är större eller lika med 1,6 i förhållande till negativa kontrollgruppen. Dosen av den positiva kontrollkemikalien ska väljas så att den inte orsakar särskilt kraftig hudirritation eller systemisk toxicitet och att induktionen är reproducerbar men inte för kraftig (t.ex. $SI > 14$ anses vara för högt värde). Rekommenderade ämnen för positiv kontroll är 25-procentig hexylkanelaldehyd (CAS-nummer 101-86-0) och 25-procentig eugenol (CAS-nummer 97-53-0) i aceton-olivoljeblandning i förhållandet 4:1 (volym/volym). I vissa fall kan även andra positiva kontrollkemikalier som uppfyller de ovan angivna kriterierna användas, förutsatt att tillbörlig motivering kan ges.
12. Även om användning av en parallell positiv kontrollgrupp rekommenderas kan det finnas betingelser där det är tillräckligt med periodisk testning (dvs. minst var sjätte månad) av den positiva kontrollen i laboratorier som regelbundet genomför LLNA: BrdU-ELISA (dvs. minst en gång i månaden) och som har en etablerad historisk databas över positiv kontroll som påvisar laboratoriets förmåga att få reproducerbara och exakta resultat från positiva kontroller. Tillräcklig kvalitet hos LLNA: BrdU-ELISA kan framgångsrikt påvisas genom att enhetliga positiva resultat erhålls från den positiva kontrollen vid minst tio oberoende testningar som genomförs inom en skälig tidsperiod (dvs. kortare än ett år).
13. Parallell positiv kontrollgrupp ska alltid användas när det sker ändringar rörande testningsförfarandet (t.ex. ny personal, nya material och/eller reagenser, annorlunda utrustning, byte av testdjurens ursprung), och sådana ändringar bör dokumenteras i laboratorierapporter. Man bör överväga om dessa ändringar påverkar den tidigare etablerade historiska databasens lämplighet, för att kunna avgöra om det behövs en ny historisk databas för dokumentering av den positiva kontrollens resultatenhetlighet.

14. Man bör vara medveten om att beslut om att använda positiva kontroller med vissa intervaller i stället för parallellt har återverkningar på lämpligheten och godtagbarheten hos negativa undersökningresultat som fås utan parallell positiv kontroll under den tid som löper mellan de periodiska undersökningarna med positiv kontroll. Om man t.ex. får falska negativa resultat vid ett periodiskt test av positiv kontroll, måste man kanske ifrågasätta resultat som erhållits mellan det sista godtagbara periodiska testet med positiv kontroll och ett icke-godtagbart periodiskt test med positiv kontroll. Följderna av dessa utfall bör övervägas noggrant när man avgör huruvida parallella positiva kontroller ska användas eller om de positiva kontrollerna enbart ska vara periodiska. Likaså bör man överväga användning av färre djur i den parallella positiva kontrollgruppen när detta är vetenskapligt motiverat och laboratoriet med stöd av laboratoriespecifika historiska data kan påvisa att färre möss kan användas (17).
15. Även om det positiva kontrollämnet bör testas i en vehikel som veterligen framkallar en enhetlig respons (t.ex. aceton-olivoljeblandning i förhållandet 4:1 (volym/volym)), kan det förekomma vissa föreskriftsreglerade situationer där det även behövs testning i en icke-standardmässig vehikel (kliniskt och kemiskt relevant formulering) (18). Om det parallella positiva kontrollämnet testas i en annan vehikel än den som används för testämnet, bör en separat kontrollgrupp användas för den parallella positiva kontrollen.
16. I fall där utvärdering görs av testämnen av en viss kemisk klass eller med en viss responsskala kan det också vara värdefullt med referensämnen för att påvisa att testmetoden fungerar tillfredsställande för bestämning av hudsensibiliseringspotentialen hos dessa typer av testämnen. Ett lämpligt referensämne ska ha följande egenskaper:
- Strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas.
 - Kända fysikalisk-kemiska egenskaper.
 - Stödande data från LLNA: BrdU-ELISA.
 - Stödande data från andra djurmodeller och/eller från människor.

TESTFÖRFARANDE

Antalet djur och dosnivåer

17. Minst fyra djur per dosgrupp och minst tre koncentrationer av testämnet bör användas. Dessutom används en parallell negativ kontrollgrupp som endast behandlas med samma vehikel som används för testämnet och en grupp för positiv kontroll (parallell eller nyligen gjord, enligt laboratoriets principer för överväganden enligt punkterna 11–15). Man bör överväga flera upprepade doser av det positiva kontrollämnet, särskilt när den positiva kontrollen testas periodiskt. Med undantag för behandling med testämnet bör djuren i kontrollgrupperna hanteras på exakt samma sätt som djuren i dosgrupperna.
18. Doser och vehikel väljs på grundval av rekommendationerna i hänvisningarna 2 och 19. Doserna väljs i regel enligt en lämplig koncentrationsserie såsom 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, osv. Valet av koncentrationsserie ska ges tillbörlig vetenskaplig motivering. All existerande tillgänglig och relevant toxikologisk information (t.ex. akut toxicitet och hudirritation) samt strukturell och fysikalisk-kemisk information om testämnet (och/eller strukturellt besläktade ämnen) bör övervägas vid valet av de tre på varandra följande koncentrationerna så att den högsta koncentrationen ger maximal exponering samtidigt som systemisk toxicitet och särskilt kraftig lokal hudirritation undviks (19) (20 och kapitel B.4 i denna bilaga). Om sådan information inte finns kan det vara nödvändigt att först genomföra ett preliminärt screeningtest (se punkterna 21–24).
19. Vehikeln får inte störa eller snedvrider testresultaten och ska väljas med tanke på största möjliga löslighet för att få högsta möjliga koncentration samtidigt som man får en lösning/suspension som är lämplig för applicering av testämnet. Som vehikel rekommenderas aceton-olivoljeblandning (4:1 volym/volym), N,N-dimetylformamid, metyletylketon, propylenglykol och dimetylsulfoxid (6) men även andra vehiklar kan användas förutsatt att tillräcklig vetenskaplig motivering kan ges. I vissa situationer kan det vara nödvändigt att som extra kontroll använda ett kliniskt relevant lösningsmedel eller en kommersiellt tillgänglig blandning där testämnet ingår. Särskild vikt bör fästas vid att se till att hydrofila testämnen inkorporeras i ett vehikelsystem som väter huden och som inte omedelbart rinner bort, genom att använda lämpliga solubilisierande ämnen (t.ex. 1-procentig Pluronic® L92). Det betyder att helt vattenbaserade vehiklar bör undvikas.
20. Genom analys av lymfnoder från individuella möss kan man bestämma variationer djuren emellan och göra en statistisk jämförelse av skillnaden mellan mätningar för testämnet och mätningarna i vehikelkontrollgruppen (se punkt 33). Dessutom kan möjligheten att minska antalet möss i den positiva kontrollgruppen endast övervägas utifrån att data samlas in individuellt per djur (17). Vidare gäller att vissa tillsynsmyndigheter kräver att data insamlas per individuellt djur. Regelbunden insamling av individuella data per djur ger en fördel rörande djurens välbefinnande eftersom upprepad testning undviks som annars skulle behövas om testämnets resultat som ursprungligen har samlats in på ett visst sätt (t.ex. genom poolade djurdata) måste granskas senare av tillsynsmyndigheter som har avvikande krav (såsom data per individuellt djur).

Preliminärt screeningtest

21. Om det inte finns tillgång till information för att bestämma högsta testdosen (se punkt 18) bör ett preliminärt screeningtest genomföras för att definiera den lämpliga dosnivån för test i LLNA: BrdU-ELISA. Syftet med det preliminära screeningtestet är att få vägledning för valet av högsta dosnivå i huvudundersökningen, i fall där information saknas om vilken koncentration som inducerar systemisk toxicitet (se punkt 24) och/eller särskilt kraftig lokal hudirritation (se punkt 23). Den högsta dosnivå som testas ska vara 100 % testämne för vätskor eller högsta möjliga koncentration för fasta ämnen eller suspensioner.
22. Det preliminära screeningtestet genomförs under identiska betingelser som vid den huvudsakliga LLNA: BrdU-ELISA-undersökningen, utom att man inte utvärderar proliferationen i lymfnoderna och man kan använda färre djur i dosgruppen. Ett eller två djur per dosgrupp föreslås. Alla möss observeras dagligen för kliniska tecken på systemisk toxicitet eller lokal irritation på appliceringsstället. Djurens kroppsvikt registreras före testningen och efter avslutad testning (dag 6). För varje mus observeras båda öronen för hudrodnad och graderas enligt tabell 1 (20 och kapitel B.4 i denna bilaga). Mätning av örontjocklek görs t.ex. med digital mikrometer eller Peacock Dial-instrument på dag 1 (före dosering), dag 3 (cirka 48 timmar efter den första dosen) och på dag 6. Dessutom kan örontjockleken bestämmas på dag 6 genom vägning av en öronbit som stansas ut efter skonsam avlivning. Särskilt kraftig lokal hudirritation indikeras genom hudrodnadsgradering ≥ 3 och/eller ökning av örontjockleken med ≥ 25 % på någon av mätningdagarna (21) (22). Den högsta dos som väljs för huvudundersökningen blir nästa lägre dos i den preliminära screeningens koncentrationsserie (se punkt 18) som inte inducerar systemisk toxicitet och/eller särskilt kraftig hudirritation.

Tabell 1

Grader av hudrodnad

Observation	Gradering
Ingen hudrodnad	0
Mycket svag rodnad (knappt skönjbar)	1
Väldefinierad hudrodnad	2
Moderat till svår hudrodnad	3
Svår hudrodnad (köttrodnad) till sårskorpebildning som utgör hinder för gradering av rodnaden	4

23. För identifiering av irriterande ämnen med LLNA har man utöver en 25-procentig ökning av örontjocklek (21) (22) också använt statistiskt signifikant ökning av örontjockleken hos behandlingsgruppens möss i jämförelse med kontrollgruppens möss (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Dock så gäller att även om statistiskt signifikanta öknings kan inträffa när ökningen av örontjocklek är mindre än 25 %, har dessa inte specifikt förknippats med särskilt kraftig irritation (25) (26) (27) (28) (29).
24. Följande kliniska observationer kan indikera systemisk toxicitet (30) när de används som del av en helhetsbedömning och kan således ge indikation om den högsta dosnivå som ska användas i huvudundersökningen: ändringar av nervsystemets funktion (t.ex. upprest päls, ataxi, skälvnningar och konvulsioner), ändringar av beteende (t.ex. aggressivitet, ändringar av putsningsbeteende, markerad ändring av aktivitetsnivå), ändringar av andningsmönster (dvs. ändringar av andningens frekvens och intensitet, såsom dyspné, gäspande och rassel) samt ändringar av födo- och vattenintag. Vid utvärderingen ska man också beakta tecken på letargi och/eller avsaknad av reaktioner, alla slags kliniska tecken på mer än lätt eller momentan smärta eller lidande, minskning av kroppsvikten med mer än 5 % från dag 1 till dag 6 samt mortalitet. Döende djur och djur som visar tecken på svår smärta och lidande ska avlivas skonsamt (31).

Huvudundersökningens försöksschema

25. För testet används följande försöksschema:

- *Dag 1:* Djuren märks individuellt och vikten samt eventuella kliniska observationer registreras. Applicera 25 μ l lämpligt utspätt testämne, ren vehikel eller positivt kontrollämne (parallell eller nyligen utförd positiv kontroll, i enlighet med laboratoriets principer när det gäller punkterna 11–15) på båda öronens baksida.
- *Dagarna 2 och 3:* Upprepa appliceringen enligt dag 1.
- *Dag 4:* Ingen behandling.
- *Dag 5:* Injicera 0,5 ml (5 mg/mus) BrdU-lösning (10 mg/ml) intraperitonealt.

- Dag 6: Registrera vikten för varje djur och eventuella kliniska observationer. Avliva djuren skonsamt cirka 24 timmar efter BrdU-injektionen. Skär bort de aurikulära dränerande lymfnoderna från varje musöra och behandla separat i fosfatbuffrad saltlösning (PBS) för varje djur. Närmare uppgifter och scheman för identifiering och dissekering av noder finns i hänvisning (17). För ytterligare kontroll av lokal hudrespons i huvudundersökningen kan tilläggsparametrar såsom gradering av örats hudrodnad eller mätningar av örats tjocklek (med tjockleksmätare eller genom vägning av utstansad bit vid obduceringen) införas i undersökningsprotokollet.

Beredning av cellsuspensioner

26. För varje mus bereds en suspension med enskilda celler av lymfnodsceller (LNC) från de bilateralt bortskurna lymfnoderna genom försiktig mekanisk sönderdelning med hjälp av ett nät av rostfritt stål (200 mesh) eller annan godkänd teknik för beredning av en suspension med enskilda celler (t.ex. sönderdelning av lymfnoderna i en engångsmortel av plast åtföljt av passage genom ett nylonnät (70 mesh)). Förfarandet för beredning av LNC-suspensionen är kritiskt för detta test och därför bör varje laboratorium se till att färdigheterna övas in på förhand. Observera att lymfnoderna i den negativa kontrollgruppens djur är små, och det är viktigt att iakta stor försiktighet för att undvika störande inverkan på SI-värdena. För varje fall ska målvolymen hos LNC-suspensionen justeras till en bestämd optimerad volym (cirka 15 ml). Den optimerade volymen baserar sig på att man för den negativa kontrollen ska få en genomsnittsabsorbans inom 0,1–0,2.

Bestämning av cellproliferation (mätning av BrdU-innehållet i lymfocyternas DNA)

27. BrdU mäts i ELISA med hjälp av ett kommersiellt tillgängligt kit (t.ex. Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland, katalognummer 11 647 229 001). Mätningen går i huvuddrag ut på att 100 µl LNC-suspension överförs till brunnarna i en flatbottnad mikrotiterplatta i tre uppsättningar. Efter fixering och denaturering av LNC tillsätts anti-BrdU-antikropp till varje brunn och tillåts reagera. Därefter avlägsnas anti-BrdU-antikroppen genom tvättning och substratlösning tillsätts så att kromogen kan bildas. Därefter mäts absorbansen vid 370 nm med en referensvåglängd på 492 nm. Under alla omständigheter gäller att testningsbetingelserna bör optimeras (se punkt 26).

OBSERVATIONER

Kliniska observationer

28. Varje mus bör observeras minst dagligen med tanke på eventuella kliniska tecken – lokal irritation vid appliceringsstället eller tecken på systemisk toxicitet. Alla observationer registreras systematiskt och individuellt per mus. Övervakningsplanerna bör inbegripa kriterier för omedelbar identifiering av tecken på systemisk toxicitet, särskilt kraftig hudirritation eller hudkorrosion så att berörda djur kan avlivas (31).

Kroppsvikt

29. Enligt det som anges i punkt 25 ska de individuella djurens vikt registreras vid försökets början och strax före den schemalagda avlivningen.

BERÄKNING AV RESULTATEN

30. Resultaten för varje behandlingsgrupp uttrycks som genomsnittet för stimulationsindex. Stimulationsindex erhålls genom att genomsnittligt värde för BrdU-märkningsindex/djur inom varje testämnesgrupp och den positiva kontrollgruppen divideras med genomsnittligt värde för BrdU-märkningsindex för kontrollgruppen för lösningsmedel/vehikel. Det genomsnittliga stimulationsindexet för vehikelkontrollgrupperna har då värdet 1.

BrdU-märkningsindex definieras enligt följande:

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

där em = emissionsvåglängd och ref = referensvåglängd.

31. Vid bedömning av resultaten anses ett resultat vara positivt när $\text{SI} \geq 1,6$ (10). Man kan dock även använda styrkan på dos-responsförhållandets samt den statistiska signifikansen och enhetligheten hos responsen i kontrollgruppen för lösningsmedel/vehikel och i den positiva kontrollen när man fastställer huruvida ett gränslösresultat (dvs. SI-värde mellan 1,6 och 1,9) ska anses vara positivt (3) (6) (32).
32. För ett gränslösresultat för positiv respons där SI-värdet ligger mellan 1,6 och 1,9 vill man kanske beakta tilläggsinformation såsom dos-responsförhållandet, tecken på systemisk toxicitet eller särskilt kraftig irritation och, där det är lämpligt, statistisk signifikans tillsammans med SI-värden för att bekräfta att resultaten är positiva (10). Likaså bör man beakta testämnets olika egenskaper, inbegripet eventuell strukturell släktskap med kända hudsensibiliserande ämnen, huruvida ämnet orsakar särskilt kraftig hudirritation hos mössen samt naturen hos det iakttagna förhållandet mellan dos och respons. Dessa och andra aspekter diskuteras närmare i andra källor (4).

33. När data samlas in per enskild mus kan man göra en statistisk analys rörande förekomsten av dosrespons och graden för dos-responsförhållande. Alla statistiska analyser kan inbegripa en utvärdering av dos-responsförhållandet och en lämpligt anpassad jämförelse mellan testgrupper (t.ex. parvisa jämförelser mellan doseringsgrupp och parallell kontrollgrupp för lösningsmedel/vehikel). De statistiska analyserna kan inbegripa t.ex. linjär regression eller Williams test för utvärdering av dos-responstrender och Dunnetts test för parvisa jämförelser. Vid valet av en lämplig metod för den statistiska analysen bör man vara medveten om eventuella olikheter hos varianserna och andra relaterade problem som kan göra det nödvändigt att göra en datatransformation eller en icke-parametrisk statistisk analys. Det kan också vara nödvändigt att genomföra beräkningar av stimulationsindex och statistiska analyser med och utan vissa datapunkter (s.k. outliers – utanförliggande värden).

DATA OCH RAPPORTERING

Data

34. Data sammanställs i tabellform med angivelse av värdena för BrdU-märkningsindex per djur, gruppens medelvärde för BrdU-märkningsindex per djur, den associerade feltermen (t.ex. SD, SEM) och medelvärdet för stimulationsindex för varje dosgrupp jämfört med den parallella kontrollgruppen för lösningsmedel/vehikel.

Testrapport

35. Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

Test- och kontrollkemikalier:

- Identifieringsdata (t.ex. CAS-nummer och EG-nummer, om tillgängligt, källa, renhet, kända orenheter, satsnummer).
- Fysikalisk natur och fysikalisk-kemiska egenskaper (t.ex. flyktighet, stabilitet, löslighet).
- För blandningar anges sammansättning och beståndsdelarnas relativa procentandelar.

Lösningsmedel/vehikel:

- Identifieringsdata (renhet, koncentration (om tillämpligt), volym som har använts).
- Motivering för val av vehikel.

Testdjur:

- CBA-mössens ursprung.
- Mikrobiologiska data för djuren, om dessa data är kända.
- Antal djur och deras ålder.
- Ursprung, inhysningsförhållanden, foder och dylikt.

Testbetingelser:

- ELISA-satsens ursprung, satsnummer och kvalitetsförsäkran/kvalitetskontrolldata (antikroppskänslighet samt detektionsspecificitet och -gräns).
- Detaljerade uppgifter om beredning och applicering av testämnet.
- Motivering för valet av dos (även resultat från preliminär screening om sådan har genomförts).
- Koncentrationerna för vehikel och testämne samt totala mängden testämne som applicerats.
- Detaljerade uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet diettyp/källa, vattenkälla).
- Detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman.
- Metoder för mätningar av toxicitet.

- Kriterier för att fastställa om resultatet är positivt eller negativt.
- Uppgifter rörande eventuella avvikelser från protokollet och redogörelse för hur avvikelsen påverkar undersökningens utformning och resultat.

Tillförlitlighetskontroll:

- Sammanfattning av resultaten från senaste tillförlitlighetskontroll, även information om testämne, koncentration och vehikel.
- Data från parallella och/eller historiska positiva kontroller och parallella negativa kontroller (lösningsmedel/vehikel) för testningslaboratoriet.
- Om försöket inte har omfattat parallell positiv kontroll, ange datum och laboratorierapport för senaste periodiska positiva kontroll och en rapport med uppgifter om laboratoriets historiska data för positiva kontroller som motivering för varför parallell positiv kontroll inte har använts.

Resultat:

- Mössens individuella vikt vid doseringsstart och vid schemalagd skonsam avlivning samt medelvärde och associerad felterm (t.ex. SD, SEM) för varje behandlingsgrupp.
- Tidpunkten för första upptäckt av tecken på toxicitet, även eventuell hudirritation vid appliceringsstället, för varje försöksdjur.
- En tabell med BrdU-märkningsindex per mus och SI-värden per behandlingsgrupp.
- Medelvärde och associerad felterm (t.ex. SD, SEM) för BrdU-märkningsindex per mus för varje behandlingsgrupp och resultaten från analys av utanförliggande värden för varje behandlingsgrupp.
- Beräknat stimulationsindex och ett lämpligt mått på variabilitet som beaktar variationen mellan djuren i testämneshgruppen och kontrollgruppen.
- Förhållandet mellan dos och respons.
- Statistisk analys, om tillämpligt.

Diskussion om resultaten:

- En kort kommentar om resultaten, dos-responsanalys och statistiska analyser (i tillämpliga fall), med en slutsats om huruvida testämnet ska anses vara hudsensibiliserande.

HÄNVISNINGAR

- (1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Finns på: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- (2) Chamberlain, M. och 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. och 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. och 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. och 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. Finns på: 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. Finns på: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm>
- (11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRRept2009.pdf
- (12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. och 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. Finns på: <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. och 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. och 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. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStd.pdf
- (18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71–89.
- (19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. och 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. Finns på: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- (21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. och 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. Finns på: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fdLLNA/BRDcomplete.pdf>

- (23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721–728.
- (29) Patterson, R.M., Noga, E. och 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. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acute/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. Finns på: <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. och 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. Finns på: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

Tillägg 1

DEFINITIONER

Exakthet: Ett mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Exakthet är ett mått på testmetodens prestanda och en relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med 'konkordans' för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (33).

Referensämne: Ett sensibiliserande eller icke-sensibiliserande ämne som används som standard för jämförelse med ett testämne. Ett referensämne ska ha följande egenskaper: i) en eller flera enhetliga och tillförlitliga källor, ii) strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas, iii) kända fysikalisk-kemiska egenskaper, iv) stödande data om kända effekter och v) känd styrka inom det önskade responsområdet.

Falsk negativt: Ett testämne som felaktigt har identifierats som negativt eller icke-aktivt genom en testmetod när ämne i själva verket är positivt eller aktivt (33).

Falskt positivt: Ett testämne som felaktigt har identifierats som positivt eller aktivt genom en testmetod när ämne i själva verket är negativt eller icke-aktivt (33).

Fara: Potentialen för skada på hälsa eller miljö. De skadliga verkningarna visar sig enbart om exponeringsnivån är tillräcklig.

Reproducerbarhet mellan laboratorier: Ett mått på i hur stor utsträckning olika kvalificerade laboratorier kan producera kvalitativt och kvantitativt liknande resultat, med användning av samma protokoll och samma testämne. Reproducerbarheten mellan laboratorier fastställs under förvalideringen och valideringen och den indikerar i hur stor utsträckning ett test framgångsrikt kan överföras mellan laboratorier (33).

Reproducerbarhet inom laboratoriet: Ett mått på i vilken utsträckning kvalificerade personer inom samma laboratorium framgångsrikt kan upprepa resultat vid olika tidpunkter när de använder ett visst protokoll (33).

Utanförliggande värde: Ett utanförliggande värde ('outlier') är en observation som markant skiljer sig från de övriga värdena i ett slumpmässigt urval från en population.

Kvalitetssäkring: En styrningsprocess där personer som är i oberoende ställning i förhållande till de personer som genomför testningen bedömer hur standarder, krav och registreringsförfaranden för laboratorietestning följs och hur exakt data förmedlas.

Tillförlitlighet: Ett mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när metoden utförs med samma protokoll. Den bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier (33).

Hudsensibilisering: En immunologisk process som följer av att en mottaglig individ exponeras ytvägen för en inducerande kemisk allergen som provocerar en kutan immunrespons som kan leda till att det uppstår kontaktsensibilisering.

Stimulationsindex (SI): Ett värde som beräknas för att bedöma hudsensibiliseringspotentialen hos ett testämne och som är förhållandet mellan proliferationen i behandlingsgrupperna och proliferationen i den parallella vehikelkontrollgruppen.

Testämne (kallas också testkemikalie): Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod."
