

II

(Μη νομοθετικές πράξεις)

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) αριθ. 640/2012 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 6ης Ιουλίου 2012

σχετικά με την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 440/2008 για καθορισμό των μεθόδων δοκιμής κατ' εφαρμογή του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH), με σκοπό την προσαρμογή του στην τεχνική πρόοδο

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

Η ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ,

Έχοντας υπόψη τη Συνθήκη για τη λειτουργία της Ευρωπαϊκής Ένωσης,

Έχοντας υπόψη τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 18ης Δεκεμβρίου 2006, για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH) και για την ίδρυση του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Χημικών Προϊόντων καθώς και για την τροποποίηση της οδηγίας 1999/45/ΕΚ και για την κατάργηση του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 793/93 του Συμβουλίου και του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1488/94 της Επιτροπής καθώς και της οδηγίας 76/769/ΕΟΚ του Συμβουλίου και των οδηγιών της Επιτροπής 91/155/ΕΟΚ, 93/67/ΕΟΚ, 93/105/ΕΚ και 2000/21/ΕΚ⁽¹⁾, και ιδίως το άρθρο 13 παράγραφος 3,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

(1) Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 440/2008 της Επιτροπής⁽²⁾ περιέχει τις μεθόδους δοκιμών για τον προσδιορισμό των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, της τοξικότητας και της οικοτοξικότητας ουσιών, οι οποίες πρέπει να εφαρμόζονται για τους σκοπούς του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006.

(2) Είναι αναγκαίο να επικαιροποιηθεί ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 440/2008, προκειμένου να συμπεριληφθούν κατά προτεραιότητα νέες και επικαιροποιημένες εναλλακτικές μέθοδοι δοκιμών, οι οποίες εγκρίθηκαν πρόσφατα από τον ΟΟΣΑ,

ώστε να επιτευχθεί μείωση του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται σε πειράματα, σύμφωνα με την οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς⁽³⁾, και με την οδηγία 86/609/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 24ης Νοεμβρίου 1986, για την προσέγγιση των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων των κρατών μελών σχετικά με την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς⁽⁴⁾. Ζητήθηκε η γνώμη των ενδιαφερομένων φορέων σχετικά με το παρόν σχέδιο.

(3) Συνεπώς, ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 440/2008 πρέπει να τροποποιηθεί αναλόγως.

(4) Τα μέτρα που προβλέπονται στον παρόντα κανονισμό είναι σύμφωνα με τη γνώμη της επιτροπής που έχει συσταθεί δυνάμει του άρθρου 133 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

Άρθρο 1

Το παράρτημα του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 440/2008 τροποποιείται σύμφωνα με το παράρτημα του παρόντος κανονισμού.

Άρθρο 2

Ο παρών κανονισμός αρχίζει να ισχύει την τρίτη ημέρα από τη δημοσίευσή του στην *Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης*.

⁽¹⁾ ΕΕ L 396 της 30.12.2006, σ. 1.⁽²⁾ ΕΕ L 142 της 31.5.2008, σ. 1.⁽³⁾ ΕΕ L 276 της 20.10.2010, σ. 33.⁽⁴⁾ ΕΕ L 358 της 18.12.1986, σ. 1.

Ο παρών κανονισμός είναι δεσμευτικός ως προς όλα τα μέρη του και ισχύει άμεσα σε κάθε κράτος μέλος.

Βρυξέλλες, 6 Ιουλίου 2012.

Για την Επιτροπή
Ο Πρόεδρος
José MANUEL BARROSO

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Το παράρτημα του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 440/2008 τροποποιείται ως εξής:

1. Το κεφάλαιο Β.42 αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«Β.42. ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ: ΤΟΠΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΛΕΜΦΑΔΕΝΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Οι κατευθυντήριες γραμμές του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών με χημικές ουσίες και οι μέθοδοι δοκιμών της ΕΕ που βασίζονται στις εν λόγω κατευθυντήριες γραμμές επανεξετάζονται κατά περιόδους με βάση την επιστημονική πρόοδο, τις μεταβαλλόμενες ανάγκες κανονιστικής ρύθμισης και τον προβληματισμό όσον αφορά την καλή μεταχείριση των ζώων. Στο παρελθόν θεσπίστηκε η αρχική μέθοδος δοκιμών για τον προσδιορισμό της δερματικής ευαισθητοποίησης σε ποντικούς, δηλαδή η τοπική δοκιμασία λεμφαδένων (LLNA — OECD Test Guideline 429, κεφάλαιο Β.42 του παρόντος παραρτήματος) (1). Έχουν δημοσιευθεί λεπτομερείς περιγραφές της επικύρωσης της LLNA, καθώς και επισκόπηση των σχετικών εργασιών (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Η επικαιροποιημένη LLNA βασίζεται στην αξιολόγηση της αποκτηθείσας πείρας και των επιστημονικών δεδομένων (12). Πρόκειται για μια δεύτερη μέθοδο δοκιμών που σχεδιάστηκε για την εκτίμηση του δερματικού ευαισθητοποιητικού δυναμικού των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) στα ζώα. Η άλλη μέθοδος δοκιμών (δηλαδή η “OECD Test Guideline 406”, κεφάλαιο Β.6 του παρόντος παραρτήματος) συνίσταται σε δοκιμές σε ινδικά χοιρίδια, συγκεκριμένα στη δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικά χοιρίδια και τη δοκιμή Buehler (13). Η LLNA προσφέρει πλεονεκτήματα έναντι της μεθόδου Β.6 και της κατευθυντήριας γραμμής “OECD Test Guideline 406” (13) από πλευράς καλής μεταχείρισης των ζώων. Η παρούσα επικαιροποιημένη μέθοδος δοκιμών LLNA περιλαμβάνει μια σειρά από πρότυπα επιδόσεων (προσάρτημα 1) τα οποία είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της κατάστασης επικύρωσης νέων και/ή τροποποιημένων μεθόδων δοκιμών που είναι λειτουργικά και μηχανιστικά παρεμφερείς με την LLNA, σύμφωνα με το καθοδηγητικό έγγραφο “OECD Guidance Document No. 34” του ΟΟΣΑ (14).
2. Η LLNA μελετά το επαγωγικό στάδιο της δερματικής ευαισθητοποίησης και παρέχει κατάλληλα ποσοτικά δεδομένα για την εκτίμηση της σχέσης δόσης-απόκρισης. Επισημαίνεται ότι οι ασθενείς/μέτριες ευαισθητοποιητικές ουσίες που συνιστάται να χρησιμοποιούνται ως θετικοί μάρτυρες στις μεθόδους δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια (δηλαδή στις μεθόδους Β.6, OECD Test Guideline 406) (13) είναι κατάλληλες και για την LLNA (6) (8) (15). Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιγράφεται επίσης, ως εναλλακτική επιλογή, μια προσέγγιση περιορισμένης LLNA (reduced LLNA/rLLNA) με την οποία είναι δυνατόν να μειωθεί ο αριθμός των χρησιμοποιούμενων ζώων έως και κατά 40 % (16) (17) (18). Η rLLNA μπορεί να χρησιμοποιείται όταν χρειάζεται να επιβεβαιωθεί, για ρυθμιστικούς λόγους, μια αρνητική πρόγνωση δυναμικού δερματικής ευαισθητοποίησης, υπό τον όρο ότι τηρούνται όλες οι υπόλοιπες προδιαγραφές του πρωτοκόλλου της LLNA, όπως περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Η πρόγνωση αρνητικού αποτελέσματος θα πρέπει να βασίζεται σε όλα τα διαθέσιμα στοιχεία, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4. Για την εφαρμογή της προσέγγισης rLLNA θα πρέπει να προβάλλονται σαφείς λόγοι και επιστημονική αιτιολόγηση. Εάν, παρά τις προβλέψεις, προκύψει θετικό ή αμφίβολο αποτέλεσμα από την rLLNA, ενδέχεται να χρειαστούν πρόσθετες δοκιμές για την ερμηνεία ή τη διασαφήνιση των ευρημάτων. Η rLLNA δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας ευαισθητοποιητικών για το δέρμα ελεγχόμενων ουσιών, όταν χρειάζεται στοιχεία σχετικά με τη σχέση δόσης-απόκρισης, λόγω χάριν για την κατάταξη σε υποκατηγορίες στο πλαίσιο του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων και του Παγκοσμίου Εναρμονισμένου Συστήματος Ταξινόμησης και Επισήμανσης Χημικών Προϊόντων (GHS).

ΟΡΙΣΜΟΙ

3. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 2.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

4. Η LLNA παρέχει μια εναλλακτική μέθοδο αναγνώρισης χημικών προϊόντων που πιθανώς προκαλούν δερματική ευαισθητοποίηση. Αυτό δεν σημαίνει κατ' ανάγκη ότι η LLNA πρέπει να χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση αντί των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια (μέθοδο Β.6, OECD Test Guideline 406) (13), αλλά μάλλον ότι είναι εφάμιλλη των τελευταίων και μπορεί να χρησιμοποιείται ως εναλλακτική λύση, η οποία κατά κανόνα δεν απαιτεί περαιτέρω επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, θετικών και αρνητικών. Πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης, το εργαστήριο δοκιμών θα πρέπει να εξετάζει όλα τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, μεταξύ των οποίων την ταυτότητα και τη χημική δομή της, τις φυσικές και χημικές ιδιότητές της, τα αποτελέσματα τυχόν άλλων δοκιμών τοξικότητας της ουσίας, in vitro ή in vivo, και τα τοξικολογικά δεδομένα που αφορούν χημικά προϊόντα ανάλογης δομής. Τα στοιχεία αυτά θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη προκειμένου να κριθεί αν η LLNA είναι κατάλληλη για την ουσία (με δεδομένη την ασυμβατότητα περιορισμένου αριθμού ειδών χημικών προϊόντων με την LLNA — βλέπε παράγραφο 5) και ως βοήθημα κατά την επιλογή δόσεων.
5. Η LLNA είναι μέθοδος in vivo και, επομένως, δεν καταργεί τη χρήση ζώων στην εκτίμηση της δραστηριότητας αλλεργικής ευαισθητοποίησης εξ επαφής. Είναι ωστόσο ικανή να περιορίσει τον αριθμό των ζώων που απαιτούνται για τον σκοπό αυτό. Επιπλέον, βελτιώνει ουσιαστικά (ελάττωση του πόνου και της δυσφορίας) τον τρόπο με τον οποίο χρησιμοποιούνται τα ζώα στις δοκιμές αλλεργικής ευαισθητοποίησης εξ επαφής. Η LLNA βασίζεται στην εξέταση των ανοσολογικών συμβάντων που προκαλούν τα χημικά προϊόντα κατά το επαγωγικό στάδιο της ευαισθητοποίησης. Σε αντίθεση με τις δοκιμές σε ινδικά χοιρίδια (μέθοδο Β.6, OECD Test Guideline 406) (13), η LLNA δεν απαιτεί την εκδήλωση των επαγόμενων από το ερέθισμα αντιδράσεων δερματικής υπερευαισθησίας. Επιπροσθέτως, δεν απαιτεί τη χρήση ανοσοενισχυτικών, όπως η δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικά χοιρίδια (13). Κατ' αυτόν τον τρόπο, η LLNA περιορίζει τους πόνους και τη δυσφορία των ζώων. Παρά τα πλεονεκτήματά της έναντι των μεθόδων Β.6 και OECD Test Guideline 406, πρέπει να αναγνωριστεί ότι υπάρχουν ορισμένοι περιοριστικοί παράγοντες που ενδέχεται να επιβάλλουν τη χρήση των Β.6 και

OECD Test Guideline 406 (13) (π.χ. ψευδαρνητικά ευρήματα κατά την LLNA με ορισμένα μέταλλα, ψευδοθετικά ευρήματα με ορισμένες ερεθιστικές για το δέρμα ουσίες [όπως ορισμένα επιφανειοδραστικά χημικά προϊόντα] (19) (20) ή η διαλυτότητα της ελεγχόμενης ουσίας). Επιπροσθέτως, η χρήση των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια (μέθοδοι B.6, OECD Test Guideline 406) (13) ενδέχεται να καταστεί αναγκαία στην περίπτωση χημικών ουσιών ή τάξεων χημικών ουσιών που περιέχουν δραστικές ομάδες οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να αποτελέσουν συγχυτικούς παράγοντες (21). Επίσης, αν ληφθεί υπόψη η περιορισμένη βάση δεδομένων επικύρωσης, η οποία περιλαμβάνει κατά κύριο λόγο σκευάσματα φυτοφαρμάκων, είναι πιθανότερο να προκύψει θετικό αποτέλεσμα για τα συγκεκριμένα είδη ελεγχόμενων ουσιών με την LLNA απ' ό,τι με τη δοκιμή σε ινδικά χοιρίδια (22). Ωστόσο, κατά τη διεξαγωγή δοκιμών με σκευάσματα, είναι δυνατόν να εξετάζεται το ενδεχόμενο συμπερίληψης ομοειδών ουσιών με γνωστά αποτελέσματα ως ουσιών συγκριτικής αξιολόγησης, ώστε να καταδεικνύεται η ορθή λειτουργία της LLNA (βλέπε παράγραφο 16). Εκτός αυτών των εντοπισθέντων περιορισμών, θεωρείται ότι η LLNA μπορεί να εφαρμοστεί στις δοκιμές οποιασδήποτε ουσίας, εκτός εάν αυτή έχει ιδιότητες που ενδέχεται να επηρεάσουν την ορθότητα της μεθόδου.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

6. Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η LLNA είναι ότι οι ευαισθητοποιητικές ουσίες επάγουν πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων των λεμφαδένων που αποχετεύουν το σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας. Ο πολλαπλασιασμός αυτός είναι ανάλογος με τη δόση και με την ισχύ του εφαρμοζόμενου αλλεργιογόνου και αποτελεί ένα απλό μέσο αντικειμενικής, ποσοτικής μέτρησης της ευαισθητοποίησης. Μετράται με σύγκριση του αριθμητικού μέσου του πολλαπλασιασμού σε κάθε ομάδα δοκιμής προς τον αριθμητικό μέσο του πολλαπλασιασμού στην ομάδα-μάρτυρα που έχει υποβληθεί σε αγωγή με τον φορέα (VC). Προσδιορίζεται ο λόγος του αριθμητικού μέσου του πολλαπλασιασμού σε κάθε ομάδα που υποβάλλεται σε αγωγή προς την αντίστοιχη τιμή για την παράλληλη ομάδα VC, ο οποίος καλείται δείκτης διέγερσης (SI) και πρέπει να είναι ≥ 3 ώστε να δικαιολογείται η ταξινόμηση μιας ελεγχόμενης ουσίας ως δύναμης ευαισθητοποιητικής για το δέρμα. Οι διαδικασίες που περιγράφονται στο παρόν κεφάλαιο βασίζονται στη χρήση ραδιοσήμανσης in vivo για τη μέτρηση ενός αυξημένου αριθμού πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων στους αποχετευτικούς ωτικούς λεμφαδένες. Ωστόσο, επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται και άλλα τελικά σημεία για την εκτίμηση του αριθμού πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, υπό τον όρο ότι πληρούνται απόλυτα οι απαιτήσεις των προτύπων για τις επιδόσεις (προσάρτημα 1).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Επιλογή ζωικού είδους

7. Το είδος που έχει επιλεγεί για τη συγκεκριμένη δοκιμή είναι ο ποντικός. Χρησιμοποιούνται νεαροί ενήλικες θηλυκοί ποντικοί της φυλής CBA/Ca ή CBA/J, που δεν έχουν ποτέ γεννήσει ούτε εγκυμονούν. Κατά την έναρξη της μελέτης, η ηλικία των ζώων πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 8 και 12 εβδομάδων και οι διαφορές βάρους μεταξύ τους πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το 20 % της μέσης τιμής. Εναλλακτικά, είναι δυνατή η χρήση άλλων φυλών, καθώς και αρσενικών ζώων, εφόσον έχουν συγκεντρωθεί επαρκή δεδομένα από τα οποία προκύπτει ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές απόκρισης κατά την LLNA, οφειλόμενες ειδικά στη φυλή και/ή το φύλο.

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

8. Οι ποντικοί πρέπει να στεγάζονται σε ομάδες (23), εκτός εάν η ατομική στέγασή τους δικαιολογείται με επαρκή επιστημονική αιτιολόγηση. Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζων πρέπει να είναι 22 ± 3 °C. Αν και η σχετική υγρασία πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εντούτοις ο στόχος θα πρέπει να είναι μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12ώρου. Για τη διατροφή επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού.

Προετοιμασία των ζώων

9. Τα ζώα επιλέγονται τυχαία, σημαίνονται με τρόπο που επιτρέπει την αναγνώριση του καθενός (αλλά όχι με αναγνωριστικό εντόμο οποιασδήποτε μορφής) και παραμένουν στους κλωβούς τους τουλάχιστον για πέντε ημέρες πριν από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων, ώστε να εγκλιματιστούν στις εργαστηριακές συνθήκες. Πριν από την έναρξη της αγωγής, εξετάζονται όλα τα ζώα για να είναι βέβαιο ότι δεν παρουσιάζουν εμφανείς βλάβες του δέρματος.

Παρασκευή των διαλυμάτων δοσολογίας

10. Πριν από την εφαρμογή στο αυτί ποντικού, τα στερεά χημικά προϊόντα πρέπει να διαλύονται, ή να σχηματίζονται εναιώρημά τους, σε κατάλληλους διαλύτες/φορείς και να αραιώνονται, εφόσον ενδείκνυται. Τα υγρά χημικά προϊόντα μπορούν να εφαρμόζονται ως έχουν ή να αραιώνονται πριν από τη χορήγηση. Τα αδιάλυτα χημικά προϊόντα, όπως αυτά που συναντώνται συνήθως στα ιατροτεχνολογικά είδη, πρέπει να υποβάλλονται σε εξαντλητική εκχύλιση με κατάλληλο διαλύτη, ώστε να παραλαμβάνονται όλα τα εκχυλίσμα συστατικά για δοκιμή πριν από την εφαρμογή στο αυτί ποντικού. Τα παρασκευάσματα της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να ανανεώνονται καθημερινά, εκτός εάν η φύλαξή τους είναι αποδεκτή βάσει των σχετικών με τη σταθερότητα στοιχείων.

Έλεγχος αξιοπιστίας

11. Χρησιμοποιούνται χημικά προϊόντα ως θετικοί μάρτυρες για να καταδειχθεί η ορθή εκτέλεση της δοκιμασίας με την απόκριση, με επαρκή και αναπαραγώγιμη ευαισθησία, σε ευαισθητοποιητική ελεγχόμενη ουσία για την οποία έχει χαρακτηριστεί επακριβώς το μέγεθος της απόκρισης. Συνιστάται η συμπερίληψη παράλληλου θετικού μάρτυρα επειδή καταδεικνύει την ικανότητα του εργαστηρίου να εκτελεί με επιτυχία κάθε δοκιμασία και καθιστά δυνατή την εκτίμηση της ενδοεργαστηριακής και διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και συγκρισιμότητας. Επίσης, καθώς ορισμένες ρυθμιστικές Αρχές απαιτούν τη χρήση θετικού μάρτυρα σε κάθε μελέτη, συνιστάται στους χρήστες να ζητούν τη γνώμη των αρμόδιων αρχών πριν από τη διεξαγωγή της LLNA. Συνιστάται, επομένως, η χρήση παράλληλου θετικού μάρτυρα ως συνήθης πρακτική, ώστε να μη χρειάζονται πρόσθετες δοκιμές σε ζώα για την κάλυψη των αναγκών που μπορεί να δημιουργήσει η περιοδική χρήση θετικών μαρτύρων (βλέπε παράγραφο 12). Ένας θετικός μάρτυρας θα πρέπει να δίδει θετική απόκριση κατά την LLNA σε επίπεδα έκθεσης τα οποία αναμένεται να προκαλέσουν αύξηση του SI σε τιμή άνω του 3 σε σύγκριση

- με την ομάδα αρνητικού μάρτυρα. Η δόση για τον θετικό μάρτυρα θα πρέπει να επιλέγεται κατά τρόπο ώστε να μην προκαλεί υπέρμετρο ερεθισμό του δέρματος ή συστηματική τοξικότητα και η επαγωγή να είναι αναπαραγώγιμη αλλά όχι υπερβολική (δηλαδή οι τιμές SI > 20 θεωρούνται υπέρμετρες). Οι προτιμώμενοι θετικοί μάρτυρες είναι το διάλυμα εξυλοκινναμωμικής αλδεύδης (αριθ. Chemical Abstracts Service [CAS] 101-86-0) 25 % σε μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου (4:1, v/v) και το διάλυμα μερκαπτο-βενζοδιαζολίου (αριθ. CAS 149-30-4) 5 % σε N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (βλέπε προσάρτημα 1, πίνακας 1). Σε ορισμένες, δεόντως αιτιολογημένες περιπτώσεις, μπορούν να χρησιμοποιούνται άλλοι θετικοί μάρτυρες που πληρούν τα προαναφερόμενα κριτήρια.
12. Παρά τη σύσταση για συμπερίληψη παράλληλης ομάδας θετικού μάρτυρα, σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να αρκεί η περιοδική δοκιμή του θετικού μάρτυρα (δηλαδή ανά διαστήματα που δεν υπερβαίνουν το εξάμηνο) για εργαστήρια που εκτελούν τακτικά LLNA (δηλαδή με συχνότητα τουλάχιστον μηνιαία) και διαθέτουν εδραιωμένη ιστορική βάση δεδομένων για τον θετικό μάρτυρα, η οποία καταδεικνύει την ικανότητα του εργαστηρίου να επιτυγχάνει αναπαραγώγιμα και ορθά αποτελέσματα με τους θετικούς μάρτυρες. Η επαρκής τεχνική ικανότητα ως προς την LLNA μπορεί να αποδειχθεί με την επίτευξη σταθερών θετικών αποτελεσμάτων με τον θετικό μάρτυρα σε 10 τουλάχιστον ανεξάρτητες δοκιμές που έχουν διεξαχθεί εντός εύλογου χρονικού διαστήματος, δηλαδή μικρότερου από ένα έτος.
13. Πρέπει να συμπεριλαμβάνεται πάντοτε παράλληλη ομάδα θετικού μάρτυρα όταν επέρχονται διαδικαστικές αλλαγές στην LLNA (π.χ. αλλαγή ειδικευμένου προσωπικού, αλλαγή υλικών και/ή αντιδραστηρίων της μεθόδου δοκιμών ή του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται σε αυτή, αλλαγή της προέλευσης των πειραματόζωων), οι οποίες πρέπει να τεκμηριώνονται στις εκθέσεις του εργαστηρίου. Πρέπει να εξετάζονται οι επιπτώσεις των αλλαγών αυτών στην επάρκεια της ήδη συγκροτημένης ιστορικής βάσης δεδομένων, προκειμένου να κριθεί αν είναι απαραίτητη η δημιουργία νέας ιστορικής βάσης δεδομένων για την τεκμηρίωση της σταθερότητας των αποτελεσμάτων που προκύπτουν με τους θετικούς μάρτυρες.
14. Οι ερευνητές θα πρέπει να γνωρίζουν ότι η απόφαση για διεξαγωγή περιοδικής και όχι ταυτόχρονης μελέτης με θετικό μάρτυρα επηρεάζει έμμεσα την επάρκεια και τη δυνατότητα αποδοχής των αρνητικών αποτελεσμάτων που προκύπτουν χωρίς παράλληλο θετικό μάρτυρα κατά το μεσοδιάστημα μεταξύ των περιοδικών μελετών με θετικό μάρτυρα. Για παράδειγμα, σε περίπτωση ψευδαρνητικού αποτελέσματος της περιοδικής μελέτης με θετικό μάρτυρα, μπορεί να αμφισβητηθούν τα αρνητικά αποτελέσματα που προέκυψαν για την ελεγχόμενη ουσία κατά το μεσοδιάστημα μεταξύ της τελευταίας αποδεκτής περιοδικής μελέτης με θετικό μάρτυρα και της μη αποδεκτής. Οι συνέπειες αυτές θα πρέπει να λαμβάνονται επιμελώς υπόψη όταν κρίνεται αν θα συμπεριλαμβάνονται παράλληλοι θετικοί μάρτυρες ή θα διεξάγονται απλώς περιοδικές μελέτες με θετικούς μάρτυρες. Θα πρέπει επίσης να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης μικρότερου αριθμού ζώων στην παράλληλη ομάδα θετικού μάρτυρα, εφόσον δικαιολογείται από επιστημονική άποψη και το εργαστήριο καταδεικνύει τη δυνατότητα χρήσης μικρότερου αριθμού ποντικών με βάση ειδικά για το ίδιο ιστορικά δεδομένα (12).
15. Παρόλο που ο θετικός μάρτυρας θα πρέπει να ελέγχεται στον φορέα που είναι γνωστό ότι αποσπά σταθερή απόκριση (π.χ. μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου σε αναλογία 4:1, v/v), ενδέχεται να υπάρχουν περιπτώσεις όπου οι νομοθετικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τη διεξαγωγή δοκιμών και σε μη τυποποιημένο φορέα (κλινικός/χημικός συναφές σκεύασμα) (24). Σε περίπτωση δοκιμής του παράλληλου θετικού μάρτυρα και της ελεγχόμενης ουσίας σε διαφορετικούς φορείς, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται χωριστός μάρτυρας VC για τον παράλληλο θετικό μάρτυρα.
16. Όταν αξιολογούνται ελεγχόμενες ουσίες που ανήκουν σε συγκεκριμένη τάξη χημικών ουσιών ή προκαλούν συγκεκριμένο φάσμα αποκρίσεων, είναι ενδεχομένως χρήσιμες και οι ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης για να καταδειχθεί η ορθή λειτουργία της μεθόδου ως προς την ανίχνευση του δερματικού ευαισθητοποιητικού δυναμικού των συγκεκριμένων ειδών ελεγχόμενων ουσιών. Οι κατάλληλες ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης πρέπει να διαθέτουν τις ακόλουθες ιδιότητες:
- δομική και λειτουργική αναλογία προς την τάξη της ελεγχόμενης ουσίας,
 - γνωστά φυσικά/χημικά χαρακτηριστικά,
 - δεδομένα τεκμηρίωσης που προέρχονται από την LLNA,
 - δεδομένα τεκμηρίωσης που αφορούν άλλα ζωικά μοντέλα και/ή τον άνθρωπο.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

Αριθμός ζώων και επίπεδα δόσεων

17. Χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τέσσερα ζώα ανά δοσολογική ομάδα, με τρεις τουλάχιστον συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας, συν μια παράλληλη ομάδα αρνητικού μάρτυρα, που υποβάλλεται σε αγωγή μόνο με τον φορέα της ελεγχόμενης ουσίας, και έναν θετικό μάρτυρα (παράλληλο ή πρόσφατο, ανάλογα με την πολιτική που εφαρμόζει το εργαστήριο λαμβάνοντας υπόψη τις παραγράφους 11-14). Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο δοκιμής με πολλαπλές δόσεις της ουσίας που χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας, κυρίως στις περιπτώσεις διαλειπουσών δοκιμών με θετικό μάρτυρα. Η μεταχείριση και η αγωγή των ζώων των ομάδων-μαρτύρων, εκτός του ότι αυτά δεν υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία, πρέπει κατά τα άλλα να είναι πανομοιότυπες με των ζώων των ομάδων αγωγής.

18. Η επιλογή των δόσεων και του φορέα πρέπει να βασίζεται στις συστάσεις των βιβλιογραφικών πηγών (3) και (5). Επιλέγονται κατά κανόνα διαδοχικές δόσεις από κατάλληλη σειρά συγκεντρώσεων, όπως 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % κ.λπ. Η επιλογή της χρησιμοποιούμενης σειράς συγκεντρώσεων πρέπει να συνοδεύεται από επαρκή επιστημονική αιτιολόγηση. Κατά την επιλογή των τριών διαδοχικών συγκεντρώσεων, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλα τα υπάρχοντα τοξικολογικά στοιχεία (π.χ. οξεία τοξικότητα και δερματικός ερεθισμός) και στοιχεία για τη δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας (και/ή ουσιών ανάλογης δομής) που ενδιαφέρουν, έτσι ώστε η υψηλότερη συγκέντρωση να μεγιστοποιεί την έκθεση, χωρίς να προκαλεί συστηματική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος (3) (25). Εάν δεν υπάρχουν τέτοια στοιχεία, μπορεί να χρειάζεται δοκιμή προδιαλογής (βλέπε παράγραφο 21-24).
19. Ο φορέας πρέπει να μην προκαλεί συστηματικά και άλλα σφάλματα στα αποτελέσματα των δοκιμών και να επιλέγεται με γνώμονα τη μεγιστοποίηση της διαλυτότητας, ώστε να προκύπτει η μέγιστη εφικτή συγκέντρωση και, ταυτόχρονα, να σχηματίζεται κατάλληλο διάλυμα/εναιώρημα για την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας. Συνιστώνται οι ακόλουθοι φορείς: μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου (4:1, v/v), N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο, μεθυλαιθυλκετόνη, προπυλενογλυκόλη και διμεθυλοσουλφοξείδιο (19), χωρίς να αποκλείεται η χρήση άλλων, εφόσον παρέχεται επαρκής επιστημονική αιτιολόγηση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να απαιτείται η χρήση, ως πρόσθετου μάρτυρα, ενός κλινικά συναφούς διαλύτη ή του σκευάσματος του εμπορίου με τη μορφή του οποίου διατίθεται στην αγορά η ελεγχόμενη ουσία. Θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη μέριμνα για την ενσωμάτωση των υδρόφιλων ελεγχόμενων ουσιών σε ένα σύστημα φορέα το οποίο διαβρέχει το δέρμα και δεν απορρέει αμέσως, με την προσθήκη κατάλληλων διαλυτοποιητών (π.χ. 1 % Pluronic® L92). Κατά συνέπεια, θα πρέπει να αποφεύγονται οι εξ ολοκλήρου υδατικοί φορείς.
20. Η επεξεργασία λεμφαδένων μεμονωμένων ποντικών επιτρέπει την εκτίμηση της μεταβλητότητας μεταξύ των ζώων και τη στατιστική ανάλυση της διαφοράς μεταξύ των μετρήσεων της ελεγχόμενης ουσίας και των μετρήσεων της ομάδας VC (βλέπε παράγραφο 35). Επιπλέον, η συλλογή δεδομένων για μεμονωμένα ζώα καθιστά εφικτή την αξιολόγηση της δυνατότητας μείωσης του αριθμού ποντικών της ομάδας θετικού μάρτυρα (12). Επίσης, μολονότι ορισμένες ρυθμιστικές Αρχές απαιτούν τη συλλογή δεδομένων για μεμονωμένα ζώα, ενδέχεται να θεωρούν αποδεκτά τα συγχωνευμένα δεδομένα για ζώα. Στις περιπτώσεις αυτές, οι χρήστες θα έχουν ίσως την ευχέρεια να συγκεντρώνουν είτε ατομικά είτε συγχωνευμένα δεδομένα για τα ζώα.

Δοκιμή προδιαλογής

21. Όταν δεν υπάρχουν στοιχεία για τον προσδιορισμό της μέγιστης δόσης προς δοκιμή (βλέπε παράγραφο 18), θα πρέπει να εκτελείται δοκιμή προδιαλογής, προκειμένου να καθοριστεί το κατάλληλο επίπεδο δόσης για τη δοκιμή με LLNA. Η δοκιμή προδιαλογής αποσκοπεί στην καθοδήγηση κατά την επιλογή του ανώτατου επιπέδου δόσης το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την κυρίως μελέτη LLNA, στις περιπτώσεις που δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με τη συγκέντρωση η οποία επάγει συστηματική τοξικότητα (βλέπε παράγραφο 24) και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος (βλέπε παράγραφο 23). Το ανώτατο επίπεδο δόσης που χρησιμοποιείται στη δοκιμή πρέπει να είναι το 100 % της ελεγχόμενης ουσίας, εάν αυτή είναι υγρή, ή η μέγιστη δυνατή συγκέντρωση, προκειμένου για στερεά ή εναιωρήματα.
22. Η δοκιμή προδιαλογής διεξάγεται στις ίδιες συνθήκες όπως η κυρίως μελέτη LLNA, εκτός από την εκτίμηση του πολλαπλασιασμού στους λεμφαδένες, η οποία παραλείπεται, και τη δυνατότητα μείωσης του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται σε κάθε δοσολογική ομάδα. Προτείνεται η χρήση ενός ή δύο ζώων ανά δοσολογική ομάδα. Όλοι οι ποντικοί εξετάζονται καθημερινά για την ανίχνευση κλινικών σημείων συστηματικής τοξικότητας ή τοπικού ερεθισμού στο σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας. Καταγράφεται το βάρος σώματος πριν από την έναρξη και πριν από τον τεματισμό της δοκιμής (6η ημέρα). Εξετάζονται και τα δύο αυτιά κάθε ποντικού για την ανίχνευση ερυθρήματος, το οποίο βαθμολογείται με τη βοήθεια του πίνακα 1 (25). Μετράται το πάχος των αυτιών με παχύμετρο (π.χ. ψηφιακό μικρόμετρο ή παχύμετρο Peacock Dial) την 1η ημέρα (πριν από τη χορήγηση της δόσης), την 3η ημέρα (περίπου 48 ώρες μετά την πρώτη δόση) και την 6η ημέρα. Επιπλέον, το πάχος των αυτιών είναι δυνατόν να προσδιοριστεί την 6η ημέρα με προσδιορισμούς βάρους δείγματος αυτιού λαμβανόμενου με λαβίδα βιοψίας, οι οποίοι πρέπει να εκτελούνται μετά τη θανάτωση των ζώων με ευθανασία. Μια βαθμολογία ερυθρήματος ≥ 3 και/ή η αύξηση του πάχους των αυτιών κατά ≥ 25 %, σε οποιαδήποτε ημέρα μέτρησης, αποτελούν ενδείξεις υπέρμετρου τοπικού ερεθισμού του δέρματος (26) (27). Ως μέγιστη δόση για την κυρίως μελέτη LLNA επιλέγεται η αμέσως χαμηλότερη δόση στη σειρά συγκεντρώσεων της προδιαλογής (βλέπε παράγραφο 18) η οποία δεν επάγει συστηματική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος.

Πίνακας 1

Βαθμολογία ερυθρήματος

Παρατήρηση	Βαθμολογία
Απουσία ερυθρήματος	0
Πολύ ελαφρό ερύθημα (μόλις αντιληπτό)	1
Περιγεγραμμένο ερύθημα	2
Μέτριο έως σοβαρό ερύθημα	3
Σοβαρό ερύθημα (ερυθρότητα τεύτλων) έως σχηματισμός εσχάρων που εμποδίζει τη διαβάθμιση του ερυθρήματος	4

23. Εκτός από την αύξηση του πάχους των αυτιών κατά 25 % (26) (27), έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση των ερεθιστικών ουσιών κατά την LLNA η στατιστικά σημαντική αύξηση του πάχους των αυτιών των ποντικών που υποβάλλονται σε αγωγή σε σύγκριση με τους ποντικούς-μάρτυρες (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Ωστόσο, η αύξηση του πάχους των αυτιών κατά λιγότερο από 25 %, έστω και αν είναι στατιστικά σημαντική, δεν έχει συσχετιστεί ειδικά με υπέρμετρο ερεθισμό (30) (32) (33) (34).
24. Οι ακόλουθες κλινικές παρατηρήσεις, εντασόμενες σε ολοκληρωμένη εκτίμηση, είναι δυνατόν να αποτελούν ένδειξη συστημικής τοξικότητας (35) (36) και, κατ' επέκταση, να υποδεικνύουν το ανώτατο επίπεδο δόσης προς χρήση στην κυρίως μελέτη LLNA: αλλαγές στη λειτουργία του νευρικού συστήματος (π.χ. ανόρθωση τριχών, αταξία, τρόμοι, σπασμοί), στη συμπεριφορά (π.χ. επιθετικότητα, αλλαγή όσον αφορά την περιποίηση του σώματος, έντονη μεταβολή της κινητικότητας), στον αναπνευστικό ρυθμό (δηλαδή μεταβολές της συχνότητας και της έντασης των αναπνοών, όπως δύσπνοια, ασθμαίνουσα αναπνοή και ρόγχος), καθώς και στην κατανάλωση τροφής και νερού. Επιπλέον, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στην αξιολόγηση τα σημεία λήθαργου και/ή απουσίας αντίδρασης σε ερεθίσματα και κάθε κλινικό σημείο που υπερβαίνει τον ελαφρό ή στιγμιαίο πόνο και δυσφορία, η μείωση του βάρους σώματος κατά > 5 % μεταξύ 1ης και 6ης ημέρας και η θνησιμότητα. Τα ετοιμοθάνατα ζώα, καθώς και όσα παρουσιάζουν έκδηλο πόνο ή σημεία έντονης και διαρκούς δυσφορίας, πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία (37).

Πρόγραμμα πειραμάτων της κυρίως μελέτης

25. Το πρόγραμμα πειραμάτων της δοκιμασίας έχει ως εξής:

- 1η ημέρα: Κάθε ζώο ζυγίζεται χωριστά και καταγράφονται το βάρος του και οι ενδεχόμενες κλινικές παρατηρήσεις. Στη ραχιαία επιφάνεια κάθε αυτιού τοποθετούνται 25 μL κατάλληλης αραιώσης της ελεγχόμενης ουσίας, του φορέα μόνου ή του θετικού μάρτυρα (παράλληλου ή πρόσφατου, ανάλογα με την πολιτική που εφαρμόζει το εργαστήριο λαμβάνοντας υπόψη τις παραγράφους 11-15).
- 2η και 3η ημέρα: Επαναλαμβάνεται η διαδικασία εφαρμογής της ουσίας όπως την πρώτη ημέρα.
- 4η και 5η ημέρα: Καμία αγωγή.
- 6η ημέρα: Καταγράφεται το βάρος κάθε ζώου. Σε όλους τους ποντικούς, ελεγχόμενους και μάρτυρες, χορηγούνται με ένεση μέσω της ουραίας φλέβας 250 μL στείρου φυσιολογικού ορού με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS), ο οποίος περιέχει 20 μCi ($7,4 \times 10^5$ Bq) ραδιοσημασμένης με τρίτιο (^3H)-μεθυλοθυμιδίνης. Εναλλακτικά, χορηγούνται σε όλους τους ποντικούς, με ένεση μέσω της ουραίας φλέβας, 250 μL PBS που περιέχει 2 μCi ($7,4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I -ιωδοδεσοξουριδίνης και φθοροδεσοξουριδίνης σε συγκέντρωση 10^{-5} M. Μετά από πέντε ώρες, τα ζώα θανατώνονται με ευθανασία. Εκτέμνονται οι αποχετευτικοί ωτικοί λεμφαδένες από κάθε αυτί ποντικού και συνενώνονται σε PBS ανά ζώο (προσέγγιση μεμονωμένου ζώου). Εναλλακτικά, εκτέμνονται οι λεμφαδένες από κάθε αυτί και συνενώνονται σε PBS ανά ομάδα ζώων που υποβλήθηκε σε αγωγή (προσέγγιση συγχωνευμένης ομάδας αγωγής). Λεπτομέρειες και διαγράμματα για την αναγνώριση και την εκτομή των λεμφαδένων παρέχονται στη βιβλιογραφική πηγή (12). Για την περαιτέρω παρακολούθηση της τοπικής απόκρισης του δέρματος κατά την κυρίως μελέτη, το πρωτόκολλο της μπορεί να περιλαμβάνει πρόσθετες παραμέτρους, όπως βαθμολογία του ωτικού ερυθήματος ή μετρήσεις του πάχους των αυτιών (με τη βοήθεια παχυμέτρου ή με προσδιορισμούς βάρους δείγματος αυτιού λαμβανόμενου με λαβίδα βιοψίας κατά τη νεκροψία).

Παρασκευή κυτταρικών εναιωρημάτων

26. Παρασκευάζεται εναιώρημα μεμονωμένων λεμφοκυττάρων από τους λεμφαδένες που έχουν ληφθεί με αμφοτερόπλευρη εκτομή, σύμφωνα με την προσέγγιση μεμονωμένου ζώου ή, εναλλακτικά, με την προσέγγιση συγχωνευμένης ομάδας αγωγής, με ήπια μηχανική διάσπαση μέσω πλέγματος από ανοξειδίωτο χάλυβα με σπές των 200 μm ή με άλλη αποδεκτή τεχνική σχηματισμού εναιωρήματος μεμονωμένων κυττάρων. Τα λεμφοκύτταρα εκπλύνονται δύο φορές με περίσσεια PBS και ακολουθεί καταβύθιση του DNA με τριχλωροξικό οξύ (TCA) 5 % σε θερμοκρασία 4 °C για 18 ώρες (3). Τα σφαιρίδια του ιζήματος μεταφέρονται σε φιαλίδια σπινθηρισμών που περιέχουν 10 mL υγρού σπινθηρισμών για μέτρηση του τριτίου, αφού προηγουμένως παρασκευαστεί νέο εναιώρημά τους σε 1 mL TCA, ή μεταφέρονται κατευθείαν σε σωλήνες απαριθμητή ακτινοβολίας γ για μέτρηση του ιωδίου ^{125}I .

Προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (ενσωματωμένη ραδιενέργεια)

27. Η ενσωμάτωση ^3H -μεθυλοθυμιδίνης μετράται με απαριθμηση σπινθηρισμών ακτινοβολίας β, σε διασπάσεις ανά λεπτό (dpm). Η ενσωμάτωση ^{125}I -ιωδοδεσοξουριδίνης μετράται με απαριθμηση ^{125}I , επίσης σε dpm. Ανάλογα με την εφαρμοζόμενη προσέγγιση, η ενσωμάτωση εκφράζεται είτε σε dpm/ποντικό (προσέγγιση μεμονωμένου ζώου) ή σε dpm/ομάδα αγωγής (προσέγγιση συγχωνευμένης ομάδας αγωγής).

Περιορισμένη LLNA

28. Σε ορισμένες περιπτώσεις, στις οποίες χρειάζεται να επιβεβαιωθεί, για ρυθμιστικούς λόγους, μια αρνητική πρόγνωση δυναμικού δερματικής ευαισθητοποίησης, επιτρέπεται η χρήση ενός προαιρετικού πρωτοκόλλου περιορισμένης LLNA (rLLNA) (16) (17) (18) που προβλέπει μικρότερο αριθμό ζώων, υπό τον όρο ότι τηρούνται όλες οι υπόλοιπες προδιαγραφές του πρωτοκόλλου της LLNA που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Για την εφαρμογή της προσέγγισης rLLNA θα πρέπει να προβάλλονται σαφείς λόγοι και επιστημονική αιτιολόγηση. Εάν προκύψει θετικό ή αμφίβολο αποτέλεσμα, ενδέχεται να χρειαστούν πρόσθετες δοκιμές για την ερμηνεία ή τη διασαφήνιση των ευρημάτων.

29. Δεδομένου ότι η μόνη διαφορά μεταξύ των πρωτοκόλλων των μεθόδων δοκιμών LLNA και rLLNA είναι η μείωση του αριθμού των δοσολογικών ομάδων, η rLLNA δεν παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη σχέση δόσης-απόκρισης. Συνεπώς, δεν πρέπει να χρησιμοποιείται όταν χρειάζονται στοιχεία για τη σχέση δόσης-απόκρισης. Όπως και στην LLNA πολλαπλών δόσεων, η συγκέντρωση ελεγχόμενης ουσίας που αξιολογείται κατά την rLLNA πρέπει να είναι η μέγιστη συγκέντρωση η οποία δεν επάγει έκδηλη συστηματική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος στους ποντικούς (βλέπε παράγραφο 18).

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Κλινικές παρατηρήσεις

30. Κάθε ποντικός πρέπει να εξετάζεται με προσοχή, τουλάχιστον μία φορά ημερησίως, για την ανίχνευση κλινικών σημείων είτε τοπικού ερεθισμού στο σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας είτε συστηματικής τοξικότητας. Όλες οι παρατηρήσεις καταγράφονται συστηματικά σε χωριστό αρχείο για κάθε ποντικό. Τα σχέδια παρακολούθησης πρέπει να περιλαμβάνουν κριτήρια για τον ταχύ εντοπισμό, με σκοπό την ευθανασία, των ποντικών που εμφανίζουν συστηματική τοξικότητα ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό ή διάβρωση του δέρματος (37).

Βάρος σώματος

31. Όπως αναφέρεται στην παράγραφο 25, το βάρος κάθε ζώου πρέπει να μετράται κατά την έναρξη της δοκιμής και κατά τον προγραμματισμένο χρόνο ευθανασίας.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

32. Τα αποτελέσματα για κάθε ομάδα αγωγής εκφράζονται σε SI. Όταν εφαρμόζεται η προσέγγιση μεμονωμένου ζώου, ο SI προκύπτει με διαίρεση της μέσης τιμής dpm/ποντικό κάθε ομάδας αγωγής με την ελεγχόμενη ουσία, όπως επίσης και της ομάδας θετικού μάρτυρα, διά της μέσης τιμής dpm/ποντικό της ομάδας που υποβλήθηκε σε αγωγή με τον διαλύτη/ομάδας VC. Στην περίπτωση αυτή, ο μέσος SI για τις ομάδες VC ισούται με τη μονάδα. Όταν εφαρμόζεται η προσέγγιση συγχωνευμένης ομάδας αγωγής, ο SI προκύπτει με διαίρεση της συγχωνευμένης ενσωμάτωσης ραδιενεργού ισότοπου σε κάθε ομάδα αγωγής διά της ενσωμάτωσης στη συγχωνευμένη ομάδα VC. Το αποτέλεσμα της πράξης αυτής είναι η μέση τιμή SI.
33. Στη διαδικασία λήψης απόφασης, ένα αποτέλεσμα θεωρείται θετικό όταν $SI \geq 3$. Ωστόσο, όταν κρίνεται αν ένα οριακό αποτέλεσμα θα χαρακτηριστεί ή όχι θετικό, μπορούν επίσης να χρησιμοποιούνται η ισχύς της σχέσης δόσης-απόκρισης, η στατιστική σημαντικότητα και η σταθερότητα των αποκρίσεων των μαρτύρων που υποβάλλονται σε αγωγή με τον διαλύτη/φορέα και των θετικών μαρτύρων (4) (5) (6).
34. Εάν απαιτείται διασαφήνιση των αποτελεσμάτων, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη διάφορες ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας, μεταξύ των οποίων το κατά πόσον έχει δομική σχέση με γνωστές ευαισθητοποιητικές για το δέρμα ουσίες, το κατά πόσον προκαλεί υπέρμετρο ερεθισμό του δέρματος του ποντικού και το είδος της σχέσης δόσης-απόκρισης που διαπιστώθηκε. Αυτά και άλλα κριτήρια αναλύονται στη βιβλιογραφική πηγή (7).
35. Η συλλογή δεδομένων ραδιενέργειας σε επίπεδο μεμονωμένου ποντικού καθιστά δυνατή τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων για τη διαπίστωση της ύπαρξης σχέσης δόσης-απόκρισης και του βαθμού της σχέσης αυτής. Η ενδεχόμενη στατιστική εκτίμηση θα μπορούσε να περιλαμβάνει αξιολόγηση της σχέσης δόσης-απόκρισης, καθώς και κατάλληλα προσαρμοσμένες συγκρίσεις των ομάδων δοκιμής (π.χ. συγκρίσεις κατά ζεύγη μεταξύ της ομάδας που λαμβάνει τη δόση και της παράλληλης ομάδας VC). Οι στατιστικές αναλύσεις είναι δυνατόν να περιλαμβάνουν, λόγω χάριν, γραμμική παλινδρόμηση ή δοκιμή Williams για την εκτίμηση των τάσεων της απόκρισης σε σχέση με τη δόση και δοκιμή Dunnett για τις συγκρίσεις κατά ζεύγη. Κατά την επιλογή της ενδεδειγμένης μεθόδου στατιστικής ανάλυσης, ο ερευνητής θα πρέπει να έχει επίγνωση των πιθανών άνισων διακυμάνσεων (διασπορών) και άλλων συναφών προβλημάτων τα οποία ενδέχεται να επιβάλλουν μετασχηματισμό των δεδομένων ή μη παραμετρική στατιστική ανάλυση. Σε κάθε περίπτωση, ενδέχεται να χρειαστεί να εκτελέσει ο ερευνητής υπολογισμούς του SI και στατιστικές αναλύσεις με και χωρίς ορισμένα σημεία δεδομένων (καλούμενα μερικές φορές "έκτροπες τιμές").

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ

Δεδομένα

36. Τα δεδομένα πρέπει να συγκεφαλαιώνονται με τη μορφή πίνακα. Στην περίπτωση της προσέγγισης μεμονωμένου ζώου, αναφέρονται η τιμή dpm για κάθε ζώο, η ομαδική μέση τιμή dpm/ζώο, η σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM) και η μέση τιμή του SI για κάθε δοσολογική ομάδα σε σύγκριση με την παράλληλη ομάδα VC. Στην περίπτωση της προσέγγισης συγχωνευμένης ομάδας αγωγής, αναφέρονται η μέση τιμή/διάμεσος dpm και η μέση τιμή του SI για κάθε δοσολογική ομάδα σε σύγκριση με την παράλληλη ομάδα VC.

Έκθεση δοκιμής

37. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιέχει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία και μάρτυρες:

- στοιχεία ταυτότητας (π.χ. αριθ. CAS και EC, εφόσον υπάρχουν, πηγή, καθαρότητα, γνωστές προσμίξεις, αριθμός παρτίδας),
- σύσταση και φυσικές και χημικές ιδιότητες (π.χ. πτητικότητα, σταθερότητα, διαλυτότητα),

- προκειμένου για μείγματα, σύνθεση και εκατοστιαία αναλογία των συστατικών.

Διαλύτης/φορέας:

- στοιχεία ταυτότητας (καθαρότητα, συγκέντρωση, κατά περίπτωση, όγκος που χρησιμοποιήθηκε),
- αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα.

Ζώα της δοκιμής:

- προέλευση των ποντικών της φυλής CBA,
- μικροβιολογική κατάσταση των ζώων, εφόσον είναι γνωστή,
- αριθμός και ηλικία των ζώων,
- προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.

Συνθήκες δοκιμής:

- λεπτομέρειες για την παρασκευή και εφαρμογή του δείγματος της ελεγχόμενης ουσίας,
- αιτιολόγηση της επιλογής των δόσεων (συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων της δοκιμής προδιαλογής, εφόσον έχει διεξαχθεί),
- συγκεντρώσεις φορέα και ελεγχόμενης ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν και συνολική ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας που χορηγήθηκε,
- λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού (μεταξύ άλλων, τύπος/προέλευση του σιτηρεσίου, προέλευση του νερού),
- λεπτομέρειες για τα προγράμματα αγωγής και δειγματοληψίας,
- μέθοδοι μέτρησης της τοξικότητας,
- κριτήρια χαρακτηρισμού της μελέτης ως θετικής ή αρνητικής,
- λεπτομέρειες για τυχόν παρεκκλίσεις από το πρωτόκολλο και επεξήγηση του τρόπου με τον οποίο αυτές επηρεάζουν τον σχεδιασμό και τα αποτελέσματα της μελέτης.

Έλεγχος αξιοπιστίας:

- περίληψη των αποτελεσμάτων του πιο πρόσφατου ελέγχου αξιοπιστίας, συμπεριλαμβανομένων πληροφοριών σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, τη συγκέντρωση και τον φορέα που χρησιμοποιήθηκε,
- δεδομένα του εργαστηρίου δοκιμών που αφορούν τον παράλληλο και/ή ιστορικό θετικό μάρτυρα και τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα,
- εάν δεν συμπεριλήφθη στη δοκιμή παράλληλος θετικός μάρτυρας, ημερομηνία διεξαγωγής της πιο πρόσφατης περιοδικής δοκιμής με θετικό μάρτυρα και σχετική έκθεση του εργαστηρίου, καθώς και έκθεση με λεπτομερή ιστορικά δεδομένα του εργαστηρίου για τον θετικό μάρτυρα που δικαιολογούν την απόφαση να μη συμπεριληφθεί παράλληλος θετικός μάρτυρας.

Αποτελέσματα:

- βάρος κάθε ποντικού κατά την έναρξη της χορήγησης των δόσεων και κατά τον προγραμματισμένο χρόνο θανάτωσης, καθώς και μέση τιμή και σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM) για κάθε ομάδα αγωγής,
- για κάθε ζώο, χρόνος εκδήλωσης και εξέλιξη των σημείων τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένου τυχόν ερεθισμού του δέρματος στο σημείο χορήγησης,
- πίνακας με τις τιμές dp_{50} ανά ποντικό (προσέγγιση μεμονωμένου ζώου) ή τις μέσες τιμές/διαμέσους dp_{50} (προσέγγιση συγχωνευμένης ομάδας αγωγής) και τις τιμές SI για κάθε ομάδα αγωγής,

- στην περίπτωση της προσέγγισης μεμονωμένου ζώου, μέση τιμή δp₅₀/ποντικό και σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM), καθώς και τα αποτελέσματα της ανάλυσης έκτροπων τιμών, για κάθε ομάδα αγωγής,
- στην περίπτωση της προσέγγισης μεμονωμένου ζώου, υπολογισμένος SI και κατάλληλο μέτρο μεταβλητότητας στο οποίο συνεκτιμάται η μεταβλητότητα μεταξύ των ζώων, τόσο της ομάδας που υποβάλλεται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία όσο και των ομάδων-μαρτύρων,
- σχέση δόσης-απόκρισης,
- στατιστικές αναλύσεις, κατά περίπτωση.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων:

- σύντομος σχολιασμός των αποτελεσμάτων, της ανάλυσης της σχέσης δόσης-απόκρισης και, κατά περίπτωση, των στατιστικών αναλύσεων, με γνώμатеυση για τον χαρακτηρισμό ή μη της ελεγχόμενης ουσίας ως ευαισθητοποιητικής για το δέρμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) OECD (2002), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol.*, 30, 165-169.
- (3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.
- (5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.
- (6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.
- (7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.
- (8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol.*, 146, 49-59.
- (9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34: 258-273.
- (10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 274-286.
- (11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34: 249-257.
- (12) ICCVAM (2009), *Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay*, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]
- (13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<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. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol.*, 18, 281-284.
- (16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.
- (17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]
- (18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<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. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]
- (20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- (21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- (22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Διατίθεται στον ιστότοπο: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/>]
- (23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Διατίθεται στον ιστότοπο: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html
- (26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, *Toxicologist*, 96, 235.
- (27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>]

- (28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- (31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- (32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.
- (33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by *Pfiesteria* extract, *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<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. Διατίθεται στον ιστότοπο: [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. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

Προσάρτημα 1

Πρότυπα επιδόσεων για την αξιολόγηση προτεινόμενων παρεμφερών ή τροποποιημένων μεθόδων δοκιμών δερματικής ευαισθητοποίησης LLNA

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Σκοπός των προτύπων για τις επιδόσεις είναι να παρέχουν τη βάση με την οποία είναι δυνατόν να διαπιστωθεί ότι νέες μέθοδοι δοκιμών —αποκλειστικές (δηλαδή κατοχυρωμένες με δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, με εμπορικά σήματα, με καταχώριση) και μη— διαθέτουν επαρκή ορθότητα και αξιοπιστία για συγκεκριμένες δοκιμές. Τα εν λόγω πρότυπα επιδόσεων βασίζονται σε επικυρωμένες και εγκεκριμένες μεθόδους δοκιμών και μπορούν να χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της αξιοπιστίας και της ορθότητας άλλων παρεμφερών μεθόδων (καλούνται κοινώς “δοκιμές me-too”), οι οποίες στηρίζονται σε παρεμφερείς επιστημονικές αρχές και με τις οποίες μετράται ή προβλέπεται η ίδια βιολογική ή τοξική επίδραση (14).
2. Πριν από την υιοθέτηση τροποποιημένων μεθόδων (δηλαδή προτεινόμενων δυνητικών βελτιώσεων σε εγκεκριμένη μέθοδο δοκιμών), πρέπει να διενεργείται αξιολόγηση για να διαπιστωθούν οι επιδράσεις των προτεινόμενων αλλαγών στις επιδόσεις της δοκιμής και ο βαθμός στον οποίο οι εν λόγω αλλαγές επηρεάζουν τα στοιχεία που τροφοδοτούν τις υπόλοιπες συνιστώσες της διαδικασίας επικύρωσης. Ανάλογα με το πλήθος και το είδος των προτεινόμενων αλλαγών, τα δεδομένα που έχουν προκύψει και τα έγγραφα τεκμηρίωσης των εν λόγω αλλαγών, αυτές θα πρέπει να υποβάλλονται είτε στη διαδικασία επικύρωσης που περιγράφεται για τις νέες δοκιμές είτε, όπου ενδείκνυται, σε περιορισμένη εκτίμηση αξιοπιστίας και καταλληλότητας με τη βοήθεια καθιερωμένων προτύπων για τις επιδόσεις (14).
3. Οι παρεμφερείς ή τροποποιημένες μέθοδοι που προτείνεται να χρησιμοποιηθούν στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών πρέπει να αξιολογούνται για να διαπιστωθούν η αξιοπιστία και η ορθότητά τους, με τη χρήση χημικών ουσιών που καλύπτουν την πλήρη βαθμολογική κλίμακα της LLNA. Προκειμένου να αποφευχθεί η αδικαιολόγητη χρήση ζώων, συνιστάται ένθερμα σε όσους αναπτύσσουν μοντέλα να ζητούν τη γνώμη των αρμόδιων αρχών προτού αρχίσουν μελέτες επικύρωσης σύμφωνα με τα πρότυπα επιδόσεων και τις κατευθύνσεις που περιλαμβάνει η παρούσα μέθοδος δοκιμών.
4. Τα παρόντα πρότυπα επιδόσεων βασίζονται στα εναρμονισμένα πρότυπα επιδόσεων των κέντρων επικύρωσης εναλλακτικών μεθόδων ICCVAM των ΗΠΑ, ECVAM της Ευρωπαϊκής Επιτροπής και JaCVAM της Ιαπωνίας (12) για την αξιολόγηση της εγκυρότητας παρεμφερών ή τροποποιημένων εκδόσεων της LLNA. Τα πρότυπα επιδόσεων συνίστανται από τα βασικά συστατικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών, τις συνιστώμενες χημικές ουσίες αναφοράς και από επίπεδα ορθότητας και αξιοπιστίας που πρέπει να επιτυγχάνει ή να υπερβαίνει η προτεινόμενη μέθοδος.

I. Βασικά συστατικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών

5. Για να εξασφαλίζεται ότι μια παρεμφερής ή τροποποιημένη μέθοδος LLNA είναι μηχανιστικά και λειτουργικά ανάλογη με την LLNA και μετρά την ίδια βιολογική επίδραση, το πρωτόκολλο της μεθόδου δοκιμών πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

- η ελεγχόμενη ουσία πρέπει να εφαρμόζεται τοπικά και στα δύο αυτιά των ποντικών,
- ο πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων πρέπει να μετράται στους λεμφαδένες που αποχετεύουν το σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας,
- ο πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων πρέπει να μετράται κατά το επαγωγικό στάδιο της δερματικής ευαισθητοποίησης,
- η υψηλότερη δόση που επιλέγεται για τις ελεγχόμενες ουσίες πρέπει να ισούται με τη μέγιστη συγκέντρωση η οποία δεν επάγει συστηματική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος στους ποντικούς. Για τις θετικές χημικές ουσίες αναφοράς, η υψηλότερη δόση πρέπει να είναι τουλάχιστον ίση με τις τιμές EC3 της LLNA για την εκάστοτε χημική ουσία αναφοράς, χωρίς να προκαλεί συστηματική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος στους ποντικούς,
- σε κάθε μελέτη πρέπει να συμπεριλαμβάνεται παράλληλος μάρτυρας VC και, όπου ενδείκνυται, πρέπει να χρησιμοποιείται παράλληλος θετικός μάρτυρας,
- πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τέσσερα ζώα ανά δοσολογική ομάδα,
- επιτρέπεται να συγκεντρώνουν είτε ατομικά είτε συγχωνευμένα δεδομένα για τα ζώα.

Εάν δεν πληρούται οποιοδήποτε από τα ανωτέρω κριτήρια, τα παρόντα πρότυπα επιδόσεων δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επικύρωση της παρεμφερούς ή τροποποιημένης μεθόδου.

II. Κατάλογος ελάχιστων ουσιών αναφοράς

6. Στα εναρμονισμένα πρότυπα επιδόσεων των κέντρων ICCVAM των ΗΠΑ, ECVAM της Ευρωπαϊκής Επιτροπής και JaCVAM της Ιαπωνίας (12) προσδιορίζονται 18 ουσίες αναφοράς που θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατ' ελάχιστο όριο, καθώς και τέσσερις προαιρετικές ουσίες αναφοράς (δηλαδή ουσίες με τις οποίες έχουν προκύψει ψευδοθετικά ή ψευδαρνητικά αποτελέσματα κατά την LLNA σε σύγκριση με τα αποτελέσματα των δοκιμών στον άνθρωπο και σε ινδικά χοιρίδια (μέθοδος B.6 ή OECD Test Guideline 406) και οι οποίες, συνεπώς, παρέχουν τη δυνατότητα να καταδειχθούν επιδόσεις εφάμιλλες ή ανώτερες εκείνων της LLNA) που συμπεριλαμβάνονται στα πρότυπα επιδόσεων της LLNA. Τα κριτήρια βάσει των οποίων επιλέχθηκαν οι εν λόγω χημικές ουσίες ήταν τα εξής:

- ο κατάλογος των χημικών ουσιών αναφοράς καλύπτει τα είδη ουσιών που συνήθως υποβάλλονται σε δοκιμή για να διαπιστωθεί το δυναμικό δερματικής ευαισθητοποίησης και το φάσμα αποκρίσεων που η LLNA είναι ικανή να μετρά ή να προβλέπει,
- η χημική δομή των ουσιών είναι επακριβώς καθορισμένη,
- για κάθε ουσία υπάρχουν δεδομένα από δοκιμές LLNA σε ινδικά χοιρίδια (μέθοδος B.6 ή OECD Test Guideline 406) (13) και (στο μέτρο του δυνατού) δεδομένα από μελέτες στον άνθρωπο, και
- οι ουσίες είναι ευρέως διαθέσιμες στο εμπόριο.

Οι συνιστώμενες χημικές ουσίες αναφοράς παρατίθενται στον πίνακα 1. Οι μελέτες στις οποίες χρησιμοποιούνται οι προτεινόμενες χημικές ουσίες αναφοράς πρέπει να αξιολογούνται με τον φορέα που προβλέπεται για τις ουσίες αυτές στον πίνακα 1. Εάν μια ουσία του πίνακα δεν είναι διαθέσιμη, επιτρέπεται η χρήση άλλων ουσιών που πληρούν τα προαναφερόμενα κριτήρια επιλογής, με επαρκή αιτιολόγηση.

Πίνακας 1

Συνιστώμενες χημικές ουσίες αναφοράς για τα πρότυπα επιδόσεων της LLNA

A/A	Χημική ουσία (1)	Αριθ. CAS	Μορφή	Veh (2)	EC3 % (3)	N (4)	0,5x - 2,0x EC3	Πραγματικό εύρος τιμών EC3	LLNA έναντι GP	LLNA έναντι δοκιμών στον άνθρωπο
1	5-Χλωρο-2-μεθυλ-4-ισοθειαζολινόνη-3 (CMI)/2-μεθυλ-4-ισοθειαζολινόνη-3 (MI) (5)	26172-55-4/2682-20-4	Liq	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sol	AOO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-Φαινυλενοδιαμίνη	106-50-3	Sol	AOO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Χλωριούχο κοβάλτιο	7646-79-9	Sol	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Ισοευγενόλη	97-54-1	Liq	AOO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-Μερκαπτοβενζοθειαζόλιο	149-30-4	Sol	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NC	+/+	+/+
7	Κιτράλη	5392-40-5	Liq	AOO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Liq	AOO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Ευγενόλη	97-53-0	Liq	AOO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Βενζοϊκό φαινύλιο	93-99-2	Sol	AOO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Κιναμωμική αλκοόλη	104-54-1	Sol	AOO	21	1	10,5-42	NC	+/+	+/+
12	Ιμιδαζολιδινουρία	39236-46-9	Sol	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	Μεθακρυλικό μεθύλιο	80-62-6	Liq	AOO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	Χλωροβενζόλιο	108-90-7	Liq	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/ (*)
15	Ισοπροπανόλη	67-63-0	Liq	AOO	50	1	NA	NA	-/-	-/+
16	Γαλακτικό οξύ	50-21-5	Liq	DMSO	25	1	NA	NA	-/-	-/ (*)
17	Σαλικυλικό μεθύλιο	119-36-8	Liq	AOO	20	9	NA	NA	-/-	-/-
18	Σαλικυλικό οξύ	69-72-7	Sol	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/-

A/A	Χημική ουσία (1)	Αριθ. CAS	Μορφή	Veh (2)	EC3 % (3)	N (4)	0,5x - 2,0x EC3	Πραγματικό εύρος τιμών EC3	LLNA έναντι GP	LLNA έναντι δοκιμών στον άνθρωπο
Προαιρετικές ουσίες για την απόδειξη βελτιωμένων επιδόσεων σε σχέση με την LLNA										
19	Λαυρυλοθειικό νάτριο	151-21-3	Sol	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/-	+/-
20	Διμεθακρυλικός εστέρας της αιθυλενογλυκόλης	97-90-5	Liq	MEK	28	1	14-56	NC	+/-	+/+
21	Ξυλόλιο	1330-20-7	Liq	AOO	95,8	1	47,9-100	NC	+/(**)	+/-
22	Χλωριούχο νικέλιο	7718-54-9	Sol	DMSO	5	2	NA	NA	-/+	-/+

Συντμήσεις: AOO = μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου (4:1, v/v), Αριθ. CAS = αριθμός μητρώου της Chemical Abstracts Service, DMF = N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο, DMSO = διμεθυλοσουλφοξείδιο, DNCB = 2,4-δινιτρο-χλωροβενζόλιο, EC3 = κατ' εκτίμηση συγκέντρωση που απαιτείται για να προκύψει δείκτης διέγερσης ίσος με 3, GP = αποτέλεσμα δοκιμής σε ινδικά χοιρίδια (δηλαδή μέθοδος B. 6 ή OECD Test Guideline 406) (13), HCA = εξυλοκινναμωμική αλδεύδη, Liq = υγρό, LLNA = αποτέλεσμα τοπικής δοκιμασίας λεμφαδένων σε ποντικό (δηλαδή μέθοδος B. 42 ή OECD Test Guideline 429) (1), MEK = μεθυλαιθυλοκετόνη, NA = δεν εφαρμόζεται επειδή ο δείκτης διέγερσης είναι μικρότερος από 3, NC = δεν έχει υπολογιστεί επειδή τα δεδομένα προέρχονται από μία μόνο μελέτη, Sol = στερεό, Veh = φορέας χρησιμοποιούμενος στη δοκιμή.

(*) Θεωρείται ότι δεν είναι ευαισθητοποιητική για τον άνθρωπο ουσία, με βάση το γεγονός ότι δεν εντοπίστηκαν αποτελέσματα κλινικών δοκιμών επιθέματος, δεν συμπεριλαμβάνεται ως αλλεργιογόνο στα έτοιμα αντιδραστήρια για δοκιμές επιθέματος και δεν εντοπίστηκαν αναφορές περιστατικών ευαισθητοποίησης του ανθρώπου.

(**) Δεν υπάρχουν δεδομένα από δοκιμές σε ινδικά χοιρίδια.

(1) Τα παρασκευάσματα των χημικών ουσιών πρέπει να ανανεώνονται καθημερινά, εκτός εάν η φύλαξή τους είναι αποδεκτή βάσει των σχετικών με τη σταθερότητα στοιχείων.

(2) Λόγω των πιθανών επιπτώσεων των διαφόρων φορέων στις επιδόσεις της LLNA, πρέπει να χρησιμοποιείται ο φορέας που συνιστάται για κάθε χημική ουσία αναφοράς (24) (32).

(3) Μέση τιμή στις περιπτώσεις περισσότερων από μία διαθέσιμων τιμών EC3. Για τις ουσίες αρνητικού αποτελέσματος (δηλαδή με δείκτη διέγερσης κάτω του 3), παρέχεται η μέγιστη ελεγχθείσα συγκέντρωση.

(4) Πλήθος μελετών LLNA από τις οποίες προέρχονται τα δεδομένα.

(5) Κυκλοφορεί στο εμπόριο ως Kathon CG (αριθ. CAS 55965-84-9), που είναι μείγμα CMI και MI σε αναλογία 3:1. Η σχετική συγκέντρωση κάθε συστατικού κυμαίνεται από 1,1 % έως 1,25 % (CMI) και από 0,3 % έως 0,45 % (MI). Τα αδρανή συστατικά είναι άλατα του μαγνησίου (21,5 % έως 24 %) και νιτρικός χαλκός (0,15 % έως 0,17 %), ενώ η σύνθεση συμπληρώνεται με νερό σε ποσοστό 74 % έως 77 %. Το Kathon CG διατίθεται ευρέως από τις εταιρείες Sigma-Aldrich και Rohm and Haas (νυν Dow Chemical Corporation).

III. Καθορισμένα επίπεδα αξιοπιστίας και ορθότητας

7. Η ορθότητα της παρεμφερούς ή τροποποιημένης μεθόδου LLNA, αξιολογούμενη με τη βοήθεια των 18 χημικών ουσιών αναφοράς που πρέπει να χρησιμοποιούνται κατ' ελάχιστο όριο, πρέπει να είναι εφάμιλλη ή ανώτερη εκείνης που προβλέπεται στα πρότυπα επιδόσεων της LLNA. Η νέα ή τροποποιημένη μέθοδος θα πρέπει να έχει ως αποτέλεσμα την ορθή ταξινόμηση με βάση απόφαση "ναι/όχι". Ενδέχεται, όμως, να μην ταξινομούνται σωστά με τη νέα ή τροποποιημένη μέθοδο όλες οι χημικές ουσίες αναφοράς που πρέπει να χρησιμοποιούνται κατ' ελάχιστο όριο. Για παράδειγμα, σε περίπτωση εσφαλμένης ταξινόμησης μιας από τις ασθενείς ευαισθητοποιητικές ουσίες, πρέπει να εξετάζεται η δυνατότητα αιτιολόγησης της εσφαλμένης ταξινόμησης και χρήσης κατάλληλων συμπληρωματικών δεδομένων (π.χ. αποτελέσματα δοκιμών βάσει των οποίων ταξινομούνται σωστά άλλες ουσίες με φυσικές, χημικές και ευαισθητοποιητικές ιδιότητες ανάλογες με εκείνες της ουσίας που δεν ταξινομήθηκε σωστά) για την απόδειξη της ισοδυναμίας των επιδόσεων. Υπό τις συνθήκες αυτές, η κατάσταση επικύρωσης της νέας ή τροποποιημένης μεθόδου δοκιμών LLNA θα αξιολογείται κατά περίπτωση.

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα

8. Για τον προσδιορισμό της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγικότητας, η νέα ή τροποποιημένη μέθοδος LLNA πρέπει να αξιολογείται με τη χρήση ευαισθητοποιητικής ουσίας που χαρακτηρίζεται επακριβώς με την LLNA. Για τον λόγο αυτό, τα πρότυπα επιδόσεων της LLNA βασίζονται στη μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων επαναλαμβανόμενων δοκιμών με εξυλοκινναμωμική αλδεύδη (HCA). Για την εκτίμηση της ενδοεργαστηριακής αξιοπιστίας πρέπει να συνάγονται τιμές κατωφλίου εκτιμώμενης συγκέντρωσης (ECt) για την HCA από τέσσερις χωριστές δοκιμές που απέχουν χρονικά μεταξύ τους τουλάχιστον μια εβδομάδα. Ένδειξη αποδεκτής ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγικότητας αποτελεί η ικανότητα ενός εργαστηρίου να επιτυγχάνει, σε κάθε δοκιμή με HCA, τιμές ECt μεταξύ 5 % και 20 %, οι οποίες αντιστοιχούν στο πεδίο τιμών που προκύπτει αν πολλαπλασιαστεί επί 0,5-2,0 η μέση τιμή EC3 που έχει καθοριστεί για την HCA (10 %) στην LLNA (βλέπε πίνακα 1).

Διεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα

9. Η διεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα νέας ή τροποποιημένης μεθόδου LLNA πρέπει να εκτιμάται με τη χρήση δύο ευαισθητοποιητικών ουσιών που χαρακτηρίζονται επακριβώς με την LLNA. Τα πρότυπα επιδόσεων της LLNA βασίζονται στη μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων δοκιμών που διεξάγονται με HCA και 2,4-δινιτρο-χλωροβενζόλιο (DNCB) σε διαφορετικά εργαστήρια. Πρέπει να συνάγονται ανεξάρτητες τιμές HCA από μία μόνο δοκιμή, διεξαγόμενη σε τρία τουλάχιστον χωριστά εργαστήρια. Προκειμένου να καταδειχθεί αποδεκτή διεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα, κάθε εργαστήριο πρέπει να επιτυγχάνει τιμές ECt μεταξύ 5 % και 20 % για την HCA και 0,025 % έως 0,1 % για το DNCB, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τα πεδία τιμών που προκύπτουν αν πολλαπλασιαστεί επί 0,5-2,0 η μέση συγκέντρωση EC3 που έχει καθοριστεί για την HCA (10 %) και το DNCB (0,05 %) στην LLNA, αντίστοιχα (βλέπε πίνακα 1).

Προσάρτημα 2

Ορισμοί

Ορθότητα: η εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί μέτρο των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την "συμφωνία" για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (14).

Ουσία συγκριτικής αξιολόγησης: ουσία, ευαισθητοποιητική ή μη, που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για σύγκριση με ελεγχόμενη ουσία. Μια ουσία συγκριτικής αξιολόγησης πρέπει να διαθέτει τις ακόλουθες ιδιότητες: i) σταθερή(-ές) και αξιόπιστη(-ες) προέλευση(-εις), ii) δομική και λειτουργική αναλογία προς την τάξη των ελεγχόμενων ουσιών, iii) γνωστά φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά, iv) δεδομένα τεκμηρίωσης γνωστών επιδράσεων και v) γνωστή ισχύ στο εύρος της επιθυμητής απόκρισης.

Τιμή κατωφλίου εκτιμώμενης συγκέντρωσης (ECt): η κατ' εκτίμηση συγκέντρωση ελεγχόμενης ουσίας που είναι αναγκαία για να προκύψει δείκτης διέγερσης ο οποίος αποτελεί ένδειξη θετικής απόκρισης.

Εκτιμώμενη συγκέντρωση τρία (EC3): η κατ' εκτίμηση συγκέντρωση ελεγχόμενης ουσίας που είναι αναγκαία για να προκύψει δείκτης διέγερσης ίσος με 3.

Ψευδαρνητικό αποτέλεσμα: ο εσφαλμένος χαρακτηρισμός ελεγχόμενης ουσίας ως αρνητικής ή μη δραστηρικής με μέθοδο δοκιμών, ενώ στην πραγματικότητα είναι θετική ή δραστηρική.

Ψευδοθετικό αποτέλεσμα: ο εσφαλμένος χαρακτηρισμός ελεγχόμενης ουσίας ως θετικής ή δραστηρικής με δοκιμή, ενώ στην πραγματικότητα είναι αρνητική ή μη δραστηρική.

Κίνδυνος: το δυναμικό δυσμενούς επίδρασης στην υγεία ή στο περιβάλλον. Η δυσμενής επίδραση εκδηλώνεται μόνο εάν τα επίπεδα έκθεσης είναι επαρκή.

Διεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα: μέτρο του βαθμού στον οποίο διαφορετικά ειδικευμένα εργαστήρια μπορούν να επιτυγχάνουν ποιοτικά και ποσοτικά παραπλήσια αποτελέσματα, χρησιμοποιώντας το ίδιο πρωτόκολλο και υποβάλλοντας σε δοκιμή τις ίδιες ελεγχόμενες ουσίες. Η διεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα προσδιορίζεται κατά τις διαδικασίες προεπικύρωσης και επικύρωσης και αποτελεί ένδειξη του κατά πόσον υπάρχει δυνατότητα επιτυχούς μεταφοράς μιας δοκιμής μεταξύ εργαστηρίων· καλείται επίσης "αναπαραγωγικότητα μεταξύ εργαστηρίων" (14).

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα: προσδιορισμός του βαθμού στον οποίο ειδικευμένα άτομα μπορούν να επαναλάβουν με επιτυχία τα ίδια αποτελέσματα εντός του ίδιου εργαστηρίου, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο πρωτόκολλο σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Καλείται επίσης "αναπαραγωγικότητα εντός του εργαστηρίου" (14).

Δοκιμή me-too: έκφραση της καθομιλουμένης που παραπέμπει σε μέθοδο δοκιμών η οποία είναι δομικά και λειτουργικά ανάλογη με επικυρωμένη και εγκεκριμένη μέθοδο δοκιμών αναφοράς. Η εν λόγω μέθοδος δοκιμών προσφέρεται για ταχεία επικύρωση (catch-up validation). Ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την “παρεμφερή μέθοδο δοκιμών” (14).

Έκτροπη τιμή: έκτροπη τιμή (outlier) είναι μια παρατήρηση σε τυχαίο δείγμα πληθυσμού η οποία διαφέρει σημαντικά από άλλες τιμές αυτού του δείγματος.

Πρότυπα επιδόσεων: πρότυπα που βασίζονται σε επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και παρέχουν τη βάση για την αξιολόγηση της συγκρισιμότητας προτεινόμενης μεθόδου δοκιμών η οποία είναι λειτουργικά και μηχανιστικά παρεμφερής. Τα πρότυπα επιδόσεων περιλαμβάνουν: i) βασικά συστατικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών, ii) κατάλογο ελάχιστων ουσιών αναφοράς, οι οποίες έχουν επιλεγεί μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απόδειξη των αποδεκτών επιδόσεων της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς και iii) τα ανάλογα επίπεδα ορθότητας και αξιοπιστίας, που βασίζονται στα επιτευχθέντα για την επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και τα οποία πρέπει να επιδεικνύει η προτεινόμενη μέθοδος δοκιμών, όταν αξιολογείται με χρήση του καταλόγου ελάχιστων ουσιών αναφοράς (14).

Αποκλειστική μέθοδος δοκιμών: μέθοδος δοκιμών της οποίας η παραγωγή και η διανομή υπόκεινται σε περιορισμούς βάσει διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας, δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας, εμπορικών σημάτων κ.λπ.

Διασφάλιση ποιότητας: διαχειριστική διαδικασία με την οποία αξιολογούνται, από άτομα ανεξάρτητα από εκείνα που εκτελούν τις δοκιμές, η τήρηση των προτύπων, των απαιτήσεων και των διαδικασιών τήρησης αρχείων που αφορούν τις εργαστηριακές δοκιμές, καθώς και η ορθότητα της μεταφοράς δεδομένων.

Χημικές ουσίες αναφοράς: χημικές ουσίες που επιλέγονται για να χρησιμοποιηθούν στη διαδικασία επικύρωσης και για τις οποίες είναι ήδη γνωστές οι αποκρίσεις στο σύστημα δοκιμών αναφοράς in vitro ή in vivo ή στο ζωικό είδος που ενδιαφέρει. Οι εν λόγω χημικές ουσίες πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικές, αφενός των τάξεων χημικών προϊόντων στις οποίες προβλέπεται ότι θα εφαρμόζεται η μέθοδος δοκιμών και, αφετέρου, του πλήρους φάσματος των αποκρίσεων —ισχυρή, ασθενής, αρνητική— που αναμένονται για τα χημικά προϊόντα στα οποία μπορεί να εφαρμοστεί η μέθοδος. Ενδέχεται να απαιτούνται διαφορετικές σειρές χημικών ουσιών αναφοράς για τα διάφορα στάδια της διαδικασίας επικύρωσης, καθώς και για τις διάφορες μεθόδους δοκιμών και χρήσεις των δοκιμών (14).

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της δοκιμής με την επίδραση που ενδιαφέρει και του κατά πόσον αυτή έχει σημασία και είναι χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμή μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση που ενδιαφέρει. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της μεθόδου δοκιμών (14).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγει διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (14).

Δερματική ευαισθητοποίηση: ανοσολογική διαδικασία που είναι αποτέλεσμα της τοπικής έκθεσης ευπαθούς ατόμου σε επαγωγικό χημικό αλλεργιογόνο, το οποίο προκαλεί δερματική ανοσοαπόκριση που μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ευαισθητοποίησης εξ επαφής.

Δείκτης διέγερσης (SI): αριθμητική τιμή η οποία υπολογίζεται προκειμένου να εκτιμηθεί το δερματικό ευαισθητοποιητικό δυναμικό μιας ελεγχόμενης ουσίας και ισούται με την αναλογία του πολλαπλασιασμού στις ομάδες που υποβάλλονται σε αγωγή με την ουσία προς τον πολλαπλασιασμό στην ομάδα που υποβάλλεται ταυτόχρονα σε αγωγή με τον φορέα.

Ελεγχόμενη ουσία (καλούμενη επίσης “ελεγχόμενη χημική ουσία”): κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Επικυρωμένη μέθοδος δοκιμών: μέθοδος δοκιμών για την οποία έχουν ολοκληρωθεί μελέτες επικύρωσης προκειμένου να προσδιοριστούν η καταλληλότητα (συμπεριλαμβανομένης της ορθότητας) και η αξιοπιστία της για συγκεκριμένο σκοπό. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι επιδόσεις επικυρωμένης μεθόδου δοκιμών από πλευράς ορθότητας και αξιοπιστίας ενδέχεται να μην επαρκούν για να κριθεί αποδεκτή για τον προτεινόμενο σκοπό (14).»

2. Το κεφάλαιο B.46 αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«B.46. ΔΕΡΜΑΤΙΚΟΣ ΕΡΕΘΙΣΜΟΣ IN VITRO: ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΣΕ ΑΝΑΣΥΣΤΑΘΕΙΑΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Ο όρος “δερματικός ερεθισμός” αναφέρεται στην πρόκληση αναστρέψιμων βλαβών στο δέρμα μετά από εφαρμογή ελεγχόμενης ουσίας για χρονικό διάστημα έως 4 ωρών [όπως ορίζεται στο Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα για την Ταξινόμηση και Επισήμανση των Χημικών Ουσιών (GHS, από τα αρχικά των λέξεων Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemicals) των Ηνωμένων Εθνών και στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων (1) (3)]. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών προβλέπει μια διαδικασία in vitro που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας ερεθιστικών χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) της κατηγορίας 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών και του συστήματος ταξινόμησης, επισήμανσης και συσκευασίας (CLP) της ΕΕ (1) (2) (3). Στην ΕΕ και σε άλλες περιφέρειες που δεν έχουν υιοθετήσει την προαιρετική κατηγορία 3 (ήπια ερεθιστικά) του GHS των Ηνωμένων Εθνών, η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανανώριση μη ταξινομούμενων χημικών προϊόντων, δηλαδή εκείνων που κατατάσσονται στην “Καμία κατηγορία” του GHS των Ηνωμένων Εθνών και του CLP της ΕΕ (1) (3). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της δερματικής ερεθιστικότητας χημικών προϊόντων ως αυτοτελής δοκιμή υποκατάστασης των δοκιμών δερματικού ερεθισμού in vivo, στο πλαίσιο στρατηγικής κλιμακωτών δοκιμών (4 και κεφάλαιο B.4 του παρόντος παραρτήματος).

2. Η εκτίμηση του δερματικού ερεθισμού αποτελεί τυπική περίπτωση χρήσης πειραματόζων [OECD Test Guideline 404, κεφάλαιο B.4 του παρόντος παραρτήματος](4). Στο πλαίσιο του προβληματισμού για την καλή μεταχείριση των ζώων, η μέθοδος δοκιμών B.4 αναθεωρήθηκε το 2004 ώστε να επιτρέπει τον προσδιορισμό της διάβρωσης/του ερεθισμού του δέρματος με την εφαρμογή στρατηγικής κλιμακωτών δοκιμών, η οποία συνίσταται στη χρήση επικυρωμένων μεθόδων δοκιμών *in vitro* ή *ex vivo*, έτσι ώστε να αποφεύγονται ο πόνος και η ταλαιπωρία των ζώων. Τρεις επικυρωμένες μέθοδοι δοκιμών *in vitro* έχουν εγκριθεί ως κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών OECD Test Guidelines 430, 431 και 435 (5) (6) (7) και δύο μεταξύ αυτών ως κεφάλαια B.40 και B.40a του παρόντος παραρτήματος, για χρήση στο σχετικό με τη διαβρωτικότητα σκέλος της στρατηγικής κλιμακωτών δοκιμών της μεθόδου B.4 ή OECD Test Guideline 404 (4).
3. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά το τελικό σημείο ανθρώπινης υγείας “δερματικός ερεθισμός”. Βασίζεται σε ανασταθμικά ανθρώπινη επιδερμίδα (RhE), ο γενικός σχεδιασμός της οποίας (χρήση επιδερμικών κερατινοκυττάρων ανθρώπινης προέλευσης χωρίς μετασχηματισμό ως πηγής κυττάρων, αντιπροσωπευτικού ιστού και κυτταρικής αρχιτεκτονικής) μιμείται σε μεγάλο βαθμό τις βιοχημικές και φυσιολογικές ιδιότητες των ανώτερων στιβάδων του ανθρώπινου δέρματος, δηλαδή της επιδερμίδας. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει επίσης μια σειρά από πρότυπα επιδόσεων (προσάρτημα 2), τα οποία έχουν αναπτυχθεί από το κέντρο ECVAM της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (8), για την αξιολόγηση παρεμφερών και τροποποιημένων μεθόδων που βασίζονται σε RhE, σύμφωνα με το καθοδηγητικό έγγραφο OECD Guidance Document No. 34 (9).
4. Υπάρχουν τρεις επικυρωμένες μέθοδοι που συμφωνούν με την παρούσα μέθοδο δοκιμών. Έχουν ολοκληρωθεί μελέτες προεπικύρωσης, βελτιστοποίησης και επικύρωσης για μία μέθοδο *in vitro* (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), με χρήση μοντέλου RhE, η οποία κυκλοφορεί στο εμπόριο με την ονομασία EpiSkin™ (ορίζεται ως “επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς” — VRM). Σύμφωνα με επικύρωση βασισμένη σε πρότυπα επιδόσεων (21), δύο άλλες μέθοδοι δοκιμών δερματικού ερεθισμού *in vitro* σε RhE που κυκλοφορούν στο εμπόριο αποδείχθηκε ότι έχουν αποτελέσματα παραπλήσια με εκείνα της VRM —πρόκειται για τις μεθόδους EpiDerm™ SIT (EPI-200) και SkinEthic™ (22).
5. Πριν από τη χρήση προτεινόμενης παρεμφερούς ή τροποποιημένης μεθόδου δοκιμών *in vitro* σε RhE για κανονιστικούς σκοπούς, εκτός από τις μεθόδους VRM, EpiDerm™ SIT (EPI-200) και SkinEthic™, πρέπει να προσδιορίζονται η αξιοπιστία της, η καταλληλότητά της (ορθότητα) και οι περιορισμοί της προτεινόμενης χρήσης της, σύμφωνα με τις απαιτήσεις των προτύπων για τις επιδόσεις που παρατίθενται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών (προσάρτημα 2), ώστε να εξασφαλίζεται ότι οι παράμετροι αυτές είναι ανάλογες με εκείνες της VRM. Επιπλέον, πριν από την ανάπτυξη και επικύρωση παρεμφερούς ή τροποποιημένης μεθόδου δοκιμών *in vitro* σε RhE και την υποβολή της για έγκριση προς κανονιστική χρήση, συνιστάται να ανατρέχουν οι ενδιαφερόμενοι στο επεξηγηματικό έγγραφο του ΟΟΣΑ σχετικά με τη διεξαγωγή δοκιμών δερματικού ερεθισμού *in vitro* (23).

ΟΡΙΣΜΟΙ

6. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

7. Όπως κατέδειξε η μελέτη επικύρωσης (16), ένας περιοριστικός παράγοντας για τη μέθοδο δοκιμών είναι το ότι δεν επιτρέπει την κατάταξη χημικών προϊόντων στην προαιρετική κατηγορία 3 (ήπια ερεθιστικά) του GHS των Ηνωμένων Εθνών (1). Όταν η μέθοδος χρησιμοποιείται ως δοκιμή μερικής υποκατάστασης, ενδέχεται να απαιτούνται δοκιμές μεταπαρακολούθησης *in vivo* για τον πλήρη χαρακτηρισμό του δυναμικού δερματικού ερεθισμού (4 και κεφάλαιο B.4 του παρόντος παραρτήματος). Είναι γνωστό ότι η χρήση ανθρώπινου δέρματος υπόκειται σε εθνικούς και διεθνείς προβληματισμούς ηθικής φύσεως και δεοντολογικούς όρους.
8. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά τον σχετικό με τον *in vitro* δερματικό ερεθισμό σκέλος της στρατηγικής κλιμακωτών δοκιμών της μεθόδου B.4 (OECD Test Guideline 404) για τη δερματική διάβρωση/ερεθισμό (4). Ενώ δεν παρέχει επαρκή στοιχεία για τη διάβρωση του δέρματος, επισημαίνεται ότι η μέθοδος B.40a (OECD Test Guideline 431) για τη διάβρωση του δέρματος βασίζεται στο ίδιο σύστημα δοκιμών σε RhE, αλλά χρησιμοποιεί άλλο πρωτόκολλο (κεφάλαιο B.40a). Η παρούσα μέθοδος βασίζεται σε μοντέλα RhE όπου χρησιμοποιούνται ανθρώπινα κερατινοκύτταρα, τα οποία, συνεπώς, αποτελούν *in vitro* το σχετιζόμενο όργανο του είδους που ενδιαφέρει. Επιπλέον, καλύπτει το αρχικό στάδιο της αλληλουχίας αντιδράσεων (cascade)/του μηχανισμού δράσης της φλεγμονής (βλάβη των κυττάρων και των ιστών που έχει ως αποτέλεσμα εντοπισμένο τραύμα) που επιτελείται κατά τον ερεθισμό *in vivo*. Κατά την επικύρωση στην οποία στηρίζεται η παρούσα μέθοδος δοκιμών ελέγχθηκε ένα ευρύ φάσμα χημικών ουσιών, η δε εμπειρική βάση δεδομένων της μελέτης επικύρωσης καλύπτει συνολικά 58 χημικές ουσίες (16) (18) (23). Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί σε στερεά, υγρά, ημιστερεά και κηρούς. Τα υγρά μπορούν να είναι υδατικά ή μη και τα στερεά να είναι υδατοδιαλυτά ή μη. Τα στερεά πρέπει, κατά το δυνατόν, να μετατρέπονται σε λεπτόκοκκη σκόνη πριν από την εφαρμογή· δεν απαιτείται άλλη προκατεργασία του δείγματος. Τα αέρια και τα αερολύματα (αεροζόλ) δεν έχουν ακόμη αποτελέσει το αντικείμενο μελέτης επικύρωσης (24). Παρά τη θεωρητική δυνατότητα δοκιμής αερίων και αεροζόλ με την τεχνολογία RhE, δεν είναι δυνατός ο έλεγχός τους με την παρούσα μέθοδο δοκιμών. Σημειώτεον επίσης ότι οι χημικές ουσίες έντονου χρώματος ενδέχεται να παρεμποδίσουν τις μετρήσεις της κυτταρικής βιωσιμότητας και καθιστούν αναγκαία τη χρήση προσαρμοσμένων μαρτύρων για διορθώσεις (βλέπε παραγράφους 24-26).
9. Για τις ελεγχόμενες χημικές ουσίες των οποίων η ταξινόμηση είναι αναμφίβολη, αναμένεται να αρκεί μία μόνο σειρά μετρήσεων με τριπλό δείγμα ιστού. Όταν όμως το αποτέλεσμα είναι οριακό, όπως η ασυμφωνία μεταξύ των μετρήσεων των πολλαπλών δειγμάτων και/ή μια μέση τιμή βιωσιμότητας ίση με $50 \pm 5\%$, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο εκτέλεσης δεύτερης σειράς μετρήσεων, ακόμη και τρίτης σειράς, σε περίπτωση ασυμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο πρώτων σειρών.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

10. Η ελεγχόμενη χημική ουσία εφαρμόζεται τοπικά σε τρισδιάστατο μοντέλο RhE, το οποίο αποτελείται από φυσιολογικά επιδερμικά κερατινοκύτταρα ανθρώπινης προέλευσης που δεν έχουν μετασχηματιστεί και έχουν καλλιεργηθεί ώστε να σχηματίσουν μοντέλο της ανθρώπινης επιδερμίδας με επαλληλία στιβάδων υψηλής διαφοροποίησης. Το μοντέλο αυτό συνίσταται από τις εξής οργανωμένες στιβάδες: βασική, ακανθώδη και κοκκώδη, καθώς και από πολυστρωματική κεράτινη στιβάδα που περιέχει μεσοκυττάρια φολιδωτά στρώματα λιπιδίων που αντιπροσωπεύουν τις κυριότερες κατηγορίες λιπιδίων, τα οποία είναι ανάλογα με εκείνα που συναντώνται *in vivo*.

11. Ο επαγόμενος από χημική ουσία ερεθισμός του δέρματος, ο οποίος εκδηλώνεται με ερύθημα και οίδημα, είναι αποτέλεσμα μιας ακολουθίας συμβάντων που αρχίζει με διείσδυση στην κεράτινη στιβάδα και πρόκληση βλάβης στις υποκείμενες στιβάδες κερατινοκυττάρων. Τα θνήσκοντα κερατινοκύτταρα ελευθερώνουν μεσολαβητές που αρχίζουν την αλληλουχία αντιδράσεων της φλεγμονής στο χόριο, ιδίως στα στρωματικά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Το παρατηρούμενο ερύθημα και οίδημα οφείλεται ακριβώς στη διάταση και την αυξημένη διαπερατότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων (24). Οι μέθοδοι που βασίζονται σε RhE μετρούν τα εναρκτήρια συμβάντα της αλληλουχίας.
12. Η κυτταρική βιωσιμότητα στα μοντέλα RhE μετράται με ενζυμική μετατροπή της χρωστικής ζωτικής χρώσης MTT [βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, μπλε του θειαζολυλίου, αριθ. CAS: 298-93-1] σε μπλε άλας φορμαζάνης, το οποίο προσδιορίζεται ποσοτικά μετά την εκχύλιση του από τους ιστούς (25). Οι ερεθιστικές χημικές ουσίες αναγνωρίζονται από την ικανότητά τους να μειώνουν την κυτταρική βιωσιμότητα σε επίπεδα χαμηλότερα από καθορισμένα κατώφλια (δηλαδή $\leq 50\%$, στην περίπτωση της κατηγορίας 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ). Ανάλογα με το κανονιστικό πλαίσιο εντός του οποίου χρησιμοποιούνται τα αποτελέσματα της παρούσας μεθόδου δοκιμών, οι χημικές ουσίες που οδηγούν σε κυτταρική βιωσιμότητα υψηλότερη από τα επίπεδα κατωφλίου μπορούν να θεωρούνται μη ερεθιστικές (δηλαδή τιμή $> 50\%$ συνεπάγεται “Καμία κατηγορία”).

ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

13. Πριν χρησιμοποιήσουν στην καθημερινή πρακτική κάποια από τις τρεις επικυρωμένες μεθόδους που συμφωνούν με την παρούσα μέθοδο δοκιμών, τα εργαστήρια πρέπει να αποδείξουν την τεχνική τους ικανότητα, χρησιμοποιώντας τις δέκα χημικές ουσίες αναφοράς που παρατίθενται στον πίνακα 1. Σε περίπτωση ανάπτυξης παρεμφερών μεθόδων βάσει της παρούσας μεθόδου δοκιμών ή τροποποίησης κάποιας από τις τρεις επικυρωμένες μεθόδους, πρέπει να πληρούνται οι σχετικές με τα πρότυπα επιδόσεων απαιτήσεις του προσαρτήματος 2 της παρούσας μεθόδου δοκιμών, για να χρησιμοποιηθεί η νέα μέθοδος για δοκιμές βάσει κανονιστικών ρυθμίσεων.
14. Στο πλαίσιο της διαδικασίας απόδειξης ικανότητας, συνιστάται να ελέγχουν οι χρήστες τις ιδιότητες φραγμού των ιστών, κατά τις προδιαγραφές του παραγωγού του μοντέλου RhE, μετά την παραλαβή τους. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία στις περιπτώσεις μεταφοράς των ιστών σε μεγάλες αποστάσεις/με μεγάλη διάρκεια. Μετά την επιτυχή εδραίωση της μεθόδου και αφού αποδειχθεί η ικανότητα χρήσης της, ο εν λόγω έλεγχος δεν είναι απαραίτητος ως συνήθης πρακτική. Παρ' όλα αυτά, όταν η μέθοδος εισάγεται στη συνήθη πρακτική, συνιστάται να συνεχίζεται η αξιολόγηση των ιδιοτήτων φραγμού σε τακτά διαστήματα.

Πίνακας 1

Χημικές ουσίες αναφοράς (1)

Χημική ουσία	Αριθ. CAS	Βαθμολογία in vivo (2)	Φυσική κατάσταση	Κατηγορία του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ
ναφθαλινοξικό οξύ	86-87-3	0	Στερεό	Καμία
ισοπροπανόλη	67-63-0	0,3	Υγρό	Καμία
στεατικό μεθύλιο	112-61-8	1	Στερεό	Καμία
βουτυρικό επτύλιο	5870-93-9	1,7	Υγρό	Καμία (Προαιρετική κατηγορία 3) (3) (4)
σαλικυλικό εξύλιο	6259-76-3	2	Υγρό	Καμία (Προαιρετική κατηγορία 3) (3) (4)
κυκλαμιναλδεύδη	103-95-7	2,3	Υγρό	Κατηγορία 2
1-βρωμοεξάνιο	111-25-1	2,7	Υγρό	Κατηγορία 2
υδροξειδίο του καλίου (υδατικό διάλυμα 5 %)	1310-58-3	3	Υγρό	Κατηγορία 2
1-μεθυλο-3-φαινυλο-1-πιπεραζίνη	5271-27-2	3,3	Στερεό	Κατηγορία 2
επτανάλη	111-71-7	3,4	Υγρό	Κατηγορία 2

(1) Αυτές οι χημικές ουσίες αναφοράς είναι υποσύνολο των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη επικύρωσης.

(2) Βαθμολογία in vivo σύμφωνα με τη μέθοδο B.4 και την κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 404 (4).

(3) Στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών, η προαιρετική κατηγορία 3 (ήπια ερεθιστικά) του GHS των Ηνωμένων Εθνών (1) θεωρείται “Καμία κατηγορία”.

(4) Η προαιρετική κατηγορία 3 του GHS των Ηνωμένων Εθνών δεν εφαρμόζεται στο πλαίσιο του CLP της ΕΕ.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

15. Στις επόμενες παραγράφους περιγράφονται τα στοιχεία και οι διαδικασίες μιας μεθόδου δοκιμών σε RhE για την εκτίμηση του δερματικού ερεθισμού. Χρειάζεται ανασύσταση του μοντέλου RhE, το οποίο μπορεί να κατασκευαστεί στο εργαστήριο ή να ληφθεί από το εμπόριο. Έχουν συνταχθεί τυποποιημένες διαδικασίες (SOP, από τα αρχικά των λέξεων Standard Operating Procedures) για τα μοντέλα EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200) και SkinEthic™ (26) (27) (28). Οι δοκιμές θα πρέπει να διεξάγονται ως εξής:

Συστατικά Στοιχεία Της Μεθόδου Δοκιμών RhE

Γενικοί όροι

16. Πρέπει να χρησιμοποιούνται ανθρώπινα κερατινοκύτταρα, χωρίς μετασηματισμό, για την ανασύσταση του επιθηλίου. Πρέπει να υπάρχουν πολλαπλές στιβάδες βιώσιμων επιθηλιακών κυττάρων (βασική, ακανθώδης, κοκκώδης) κάτω από μία λειτουργική κεράτινη στιβάδα. Η κεράτινη στιβάδα πρέπει να είναι πολυστρωματική και να διαθέτει τα αναγκαία λιπιδικά χαρακτηριστικά, ώστε να δημιουργεί στέρεο λειτουργικό φραγμό, ανθεκτικό στην ταχεία διείσδυση κυτταροτοξικών χημικών ουσιών-δεικτών, π.χ. δωδεκυλοσουλφονικού νατρίου (SDS) ή Triton X-100. Η λειτουργία φραγμού πρέπει να καταδεικνύεται και είναι δυνατόν να εκτιμηθεί με προσδιορισμό είτε της συγκέντρωσης στην οποία μια χημική ουσία-δείκτης μειώνει τη βιωσιμότητα των ιστών κατά 50 % (IC₅₀), μετά από καθορισμένο χρόνο έκθεσης, είτε του χρόνου έκθεσης που απαιτείται για να μειωθεί η κυτταρική βιωσιμότητα κατά 50 % (ET₅₀) μετά την εφαρμογή καθορισμένης συγκέντρωσης της χημικής ουσίας-δείκτη. Οι ιδιότητες συγκράτησης του μοντέλου RhE πρέπει να αποτρέπουν την παράκαμψη της κεράτινης στιβάδας από το υλικό και την είσοδο του στον βιώσιμο ιστό, η οποία θα συνεπαγόταν ατελή μοντελοποίηση της έκθεσης του δέρματος. Το μοντέλο RhE πρέπει να μην έχει μολυνθεί με βακτηρίδια, ιούς, μυκόπλασμα ή μύκητες.

Λειτουργικοί όροι

Βιωσιμότητα

17. Για τον προσδιορισμό της τάξης μεγέθους της βιωσιμότητας χρησιμοποιείται η δοκιμασία MTT (25). Οι χρήστες του μοντέλου RhE πρέπει να εξασφαλίζουν ότι κάθε παρτίδα του εν λόγω μοντέλου πληροί καθορισμένα κριτήρια για τον αρνητικό μάρτυρα. Η οπτική πυκνότητα (OD) του διαλύτη εκχύλισης πρέπει να είναι αρκούντως χαμηλή, δηλαδή μικρότερη από 0,1. Ο δημιουργός/προμηθευτής του μοντέλου RhE καθορίζει πεδίο τιμών αποδοχής (ανώτερο και κατώτερο όριο) για την OD του αρνητικού μάρτυρα (στις συνθήκες της μεθόδου δοκιμών δερματικού ερεθισμού). Τα πεδία τιμών αποδοχής για τις τρεις επικυρωμένες μεθόδους εμφανίζονται στον πίνακα 2. Πρέπει να τεκμηριώνεται ότι οι ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα είναι σταθεροί σε καλλιέργεια (οι μετρήσεις βιωσιμότητας παρέχουν παραπλήσιες τιμές) για τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης που προβλέπεται στη δοκιμή.

Πίνακας 2

Πεδία τιμών αποδοχής για την OD του αρνητικού μάρτυρα

	Κατώτερο όριο αποδοχής	Ανώτερο όριο αποδοχής
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic™ RhE	≥ 1,2	≤ 2,5

Λειτουργία φραγμού

18. Η κεράτινη στιβάδα και η λιπιδική της σύσταση πρέπει να ανθίστανται επαρκώς στην ταχεία διείσδυση κυτταροτοξικών χημικών ουσιών-δεικτών, π.χ. SDS ή Triton X-100, όπως εκτιμάται με τη βοήθεια της τιμής IC₅₀ ή ET₅₀ (πίνακας 3).

Μορφολογία

19. Το μοντέλο RhE πρέπει να υποβάλλεται σε ιστολογική εξέταση, από την οποία να προκύπτει δομή όμοια με εκείνη της ανθρώπινης επιδερμίδας (συμπεριλαμβανομένης της ύπαρξης πολυστρωματικής κεράτινης στιβάδας).

Αναπαραγωγιμότητα

20. Τα αποτελέσματα για τη χημική ουσία που χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας και για τους αρνητικούς μάρτυρες στη μέθοδο δοκιμών πρέπει να καταδεικνύουν διαχρονική αναπαραγωγιμότητα.

Ποιοτικός έλεγχος

21. Ο δημιουργός/προμηθευτής του μοντέλου RhE πρέπει να εξασφαλίζει και να αποδεικνύει ότι κάθε παρτίδα του εν λόγω μοντέλου ανταποκρίνεται σε καθορισμένα κριτήρια αποδέσμευσης παρτίδων παραγωγής, τα σημαντικότερα από τα οποία είναι εκείνα που αφορούν τη βιωσιμότητα (παράγραφος 17), τη λειτουργία φραγμού (παράγραφος 18) και τη μορφολογία (παράγραφος 19). Τα σχετικά δεδομένα πρέπει να γνωστοποιούνται στους χρήστες της μεθόδου ώστε αυτοί να είναι σε θέση να τα συμπεριλάβουν στην έκθεση δοκιμής. Ο δημιουργός/προμηθευτής του μοντέλου RhE (ή, στις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται μοντέλο εσωτερικής κατασκευής, ο ερευνητής) πρέπει να καθορίζει πεδίο τιμών αποδοχής (άνωτερο και κατώτερο όριο) για την IC₅₀ ή τον ET₅₀. Δεκτά για την αξιόπιστη πρόγνωση της ταξινόμησης ως προς τον ερεθισμό μπορούν να γίνουν μόνο αποτελέσματα που έχουν ληφθεί με ιστούς οι οποίοι πληρούν τα κριτήρια. Στον πίνακα 3 παρατίθενται, ενδεικτικά, τα πεδία τιμών αποδοχής για τις τρεις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς.

Πίνακας 3

Παραδείγματα κριτηρίων ποιοτικού ελέγχου για την αποδέσμευση παρτίδων παραγωγής

	Κατώτερο όριο αποδοχής	Ανώτερο όριο αποδοχής
EpiSkin™ (SM) (αγωγή 18 ωρών με 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 ώρες	ET ₅₀ = 8,7 ώρες
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (28)	ET ₅₀ = 4,0 ώρες	ET ₅₀ = 9,0 ώρες

Εφαρμογή των ελεγχόμενων χημικών ουσιών και των χημικών ουσιών-μάρτυρων

22. Σε κάθε μέτρηση πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρία πανομοιότυπα δείγματα για κάθε ελεγχόμενη χημική ουσία και για τους μάρτυρες. Προκειμένου τόσο για υγρά όσο και για στερεά, πρέπει να εφαρμόζεται επαρκής ποσότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ώστε να καλύπτεται ομοιόμορφα η επιφάνεια της επιδερμίδας και, ταυτόχρονα, να αποφεύγονται οι άπειρες δόσεις, δηλαδή πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 25 μL/cm² ή 25 mg/cm². Στην περίπτωση των στερεών, η επιφάνεια της επιδερμίδας πρέπει να υγραίνεται με αποιονισμένο ή απεσταγμένο νερό πριν από την εφαρμογή, ώστε να βελτιώνεται η επαφή της με την ελεγχόμενη χημική ουσία. Τα στερεά θα πρέπει, κατά το δυνατόν, να ελέγχονται σε μορφή λεπτόκοκκης σκόνης. Στο τέλος της περιόδου έκθεσης, η ελεγχόμενη χημική ουσία πρέπει να εκπλύνεται επιμελώς από την επιφάνεια της επιδερμίδας με υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα ή με διάλυμα NaCl 0,9 %. Ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο RhE μεταξύ των τριών επικυρωμένων, η περίοδος έκθεσης κυμαίνεται από 15 έως 60 λεπτά και η θερμοκρασία επώασης από 20 έως 37 °C. Αυτές οι περίοδοι και θερμοκρασίες έκθεσης βελτιστοποιούνται για καθεμία από τις μεθόδους RhE και αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά εγγενή χαρακτηριστικά τους —για περισσότερες λεπτομέρειες, βλέπε τις τυποποιημένες διαδικασίες (SOP) των μεθόδων (26) (27) (28).
23. Σε κάθε μέτρηση πρέπει να χρησιμοποιούνται παράλληλοι αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες για να αποδεικνύεται ότι η βιωσιμότητα (με τον αρνητικό μάρτυρα), η λειτουργία φραγμού και η συνακόλουθη ευαισθησία των ιστών (με τον θετικό μάρτυρα) περικλείονται εντός καθορισμένου ιστορικού πεδίου τιμών αποδοχής. Ο συνιστώμενος θετικός μάρτυρας είναι υδατικό διάλυμα SDS 5 %. Η συνιστώμενη ως αρνητικός μάρτυρας ουσία είναι το νερό ή φυσιολογικός ορός στον οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS).

Μετρήσεις της κυτταρικής βιωσιμότητας

24. Το σημαντικότερο στοιχείο της διαδικασίας δοκιμών είναι η μέτρηση της βιωσιμότητας όχι αμέσως μετά την έκθεση στις ελεγχόμενες χημικές ουσίες, αλλά αφού προηγηθεί επώαση των εκπλυθέντων ιστών σε πρόσφατο θρεπτικό υλικό για αρκούντως μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την αγωγή. Το χρονικό αυτό διάστημα επιτρέπει τόσο την αποκατάσταση ύστερα από ασθενείς κυτταροτοξικές επιδράσεις, όσο και την εκδήλωση σαφών κυτταροτοξικών επιδράσεων. Το στάδιο βελτιστοποίησης της δοκιμής (11) (12) (13) (14) (15) κατέδειξε ότι ο βέλτιστος χρόνος επώασης μετά την αγωγή είναι 42 ώρες.
25. Η δοκιμασία MTT αποτελεί επικυρωμένη ποσοτική μέθοδο η οποία πρέπει να χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών και είναι συμβατή με τη χρήση σε τριδιάστατο ιστικό μόρφωμα. Το δείγμα ιστού φέρεται σε διάλυμα MTT κατάλληλης συγκέντρωσης (π.χ. 0,3-1 mg/mL), όπου αφήνεται να παραμείνει επί τρίωρο. Στη συνέχεια, το σχηματιζόμενο μπλε ίζημα φορμαζάνης εκχυλίζεται από τον ιστό με διαλύτη (π.χ. ισοπροπανόλη, όξινο διάλυμα ισοπροπανόλης) και μετράται η συγκέντρωση της φορμαζάνης με προσδιορισμό της OD σε μήκος κύματος 570 nm, με φίλτρο μέγιστης ζώνης διάβασης ± 30 nm.
26. Οι οπτικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ή η χημική της δράση επί της MTT ενδέχεται να παρεμποδίσουν τη δοκιμασία, με αποτέλεσμα εσφαλμένη εκτίμηση της βιωσιμότητας (επειδή η ελεγχόμενη ουσία, εκτός του ότι μπορεί να προκαλέσει τον σχηματισμό του χρώματος, μπορεί και να τον παρεμποδίσει ή να τον αναστρέψει). Αυτό ενδέχεται να συμβεί όταν μια συγκεκριμένη ελεγχόμενη χημική ουσία δεν απομακρυνθεί τελείως από τον ιστό με την έκπλυση ή διαπεράσει την επιδερμίδα. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία δρα απευθείας επί της MTT (αναγωγικά της MTT), είναι εκ φύσεως έγχρωμη ή χρωματίζεται κατά την αγωγή του ιστού, πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσθετοι μάρτυρες για την ανίχνευση και διόρθωση της παρεμπόδισης της τεχνικής μετρήσεων της βιωσιμότητας από την ελεγχόμενη ουσία. Ο τρόπος διόρθωσης της άμεσης αναγωγής της MTT και της παρεμποδιστικής δράσης των έγχρωμων ουσιών περιγράφεται λεπτομερώς στις SOP των τριών επικυρωμένων μεθόδων (26) (27) (28).

Κριτήρια αποδοχής

27. Για κάθε μέθοδο στην οποία χρησιμοποιούνται έγκυρες παρτίδες μοντέλου RhE (βλέπε παράγραφο 21), η OD των ιστών που υποβάλλονται σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα πρέπει να αντιστοιχεί στην ποιότητα των ιστών στους οποίους εφαρμόστηκαν όλα τα στάδια της αποστολής και παραλαβής και όλες οι διεργασίες του πρωτοκόλλου. Οι τιμές OD των μαρτύρων δεν πρέπει να είναι χαμηλότερες από τα ιστορικά καθορισμένα όρια. Ομοίως, οι ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με τον θετικό μάρτυρα, δηλαδή με υδατικό διάλυμα SDS 5 %, πρέπει να εκδηλώνουν την οικεία ικανότητα απόκρισης σε ερεθιστική χημική ουσία στις συνθήκες της μεθόδου δοκιμών (26) (27) (28). Πρέπει να καθορίζονται τα κατάλληλα σχετικά μέτρα μεταβλητότητας μεταξύ των πολλαπλών δειγμάτων ιστών (π.χ. εάν χρησιμοποιείται η τυπική απόκλιση (SD), η τιμή της θα πρέπει να περικλείεται εντός του μονόπλευρου διαστήματος ανοχής 95 % που έχει υπολογιστεί από ιστορικά δεδομένα για τη VRM, $SD < 18 \%$).

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων και προγνωστικό μοντέλο

28. Οι τιμές OD που προκύπτουν για κάθε ελεγχόμενη χημική ουσία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό του επί τοις εκατό ποσοστού βιωσιμότητας με κανονικοποίηση ως προς τον αρνητικό μάρτυρα, ο οποίος ορίζεται σε 100 %. Η τιμή διαχωρισμού (cut-off value) ποσοστιαίας κυτταρικής βιωσιμότητας, η οποία διακρίνει τις ερεθιστικές από τις μη ταξινομούμενες ελεγχόμενες χημικές ουσίες, καθώς και η (οι) στατιστική(-ές) διαδικασία(-ες) που χρησιμοποιείται(-ούνται) για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και την αναγνώριση των ερεθιστικών χημικών ουσιών, πρέπει να καθορίζονται επακριβώς, να τεκμηριώνονται και να είναι αποδεδειγμένα κατάλληλα. Οι τιμές διαχωρισμού για την πρόγνωση του ερεθισμού είναι οι εξής:

- η ελεγχόμενη χημική ουσία θεωρείται ερεθιστική για το δέρμα και ανήκει στην κατηγορία 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ εάν η βιωσιμότητα των ιστών ύστερα από έκθεση και επώαση μετά την αγωγή είναι μικρότερη ή ίση με (\leq) 50 %,
- ανάλογα με το κανονιστικό πλαίσιο εντός του οποίου χρησιμοποιούνται τα αποτελέσματα της παρούσας μεθόδου δοκιμών, η ελεγχόμενη χημική ουσία μπορεί να θεωρείται μη ερεθιστική για το δέρμα, υπαγόμενη στην “καμία κατηγορία” του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ εάν η βιωσιμότητα των ιστών ύστερα από έκθεση και επώαση μετά την αγωγή είναι μεγαλύτερη από ($>$) 50 %.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ*Δεδομένα*

29. Για κάθε μέτρηση, πρέπει να αναφέρονται, σε μορφή πίνακα, τα δεδομένα που προέκυψαν για κάθε επιμέρους δείγμα ιστών (π.χ. τιμές OD και υπολογισθέν επί τοις εκατό ποσοστό κυτταρικής βιωσιμότητας για κάθε ελεγχόμενη χημική ουσία, καθώς και ταξινόμηση), συμπεριλαμβανομένων δεδομένων από επαναληπτικά πειράματα, κατά περίπτωση. Επιπλέον, πρέπει να αναφέρονται, για κάθε μέτρηση, οι μέσες τιμές \pm SD. Για κάθε ελεγχόμενη χημική ουσία πρέπει να αναφέρονται οι παρατηρούμενες αλληλεπιδράσεις με το αντιδραστήριο MTT και τις έγχρωμες ελεγχόμενες χημικές ουσίες.

Έκθεση δοκιμής

30. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη χημική ουσία και μάρτυρες:

- χημική(-ές) ονομασία(-ες), όπως ονομασία και αριθμός CAS, ονομασία και αριθμός EC, εφόσον είναι γνωστά,
- καθαρότητα και σύσταση της χημικής ουσίας (σε κατά βάρος εκατοστιαία αναλογία),
- φυσικές/χημικές ιδιότητες που έχουν σημασία για τη διεξαγωγή της μελέτης (π.χ. φυσική κατάσταση, σταθερότητα, πτητικότητα, pH και υδατοδιαλυτότητα, εάν είναι γνωστή),
- κατεργασία της ελεγχόμενης ουσίας/των μαρτύρων πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, κωνιοποίηση),
- συνθήκες αποθήκευσης.

*Αιτιολόγηση του μοντέλου RhE και του πρωτοκόλλου που χρησιμοποιήθηκαν.**Συνθήκες δοκιμής:*

- χρησιμοποιηθέν κυτταρικό σύστημα,
- πλήρη στοιχεία τεκμηρίωσης για το συγκεκριμένο μοντέλο RhE που χρησιμοποιήθηκε, συμπεριλαμβανομένων των επιδόσεων του. Τα εν λόγω στοιχεία πρέπει να περιλαμβάνουν τα ακόλουθα, χωρίς να περιορίζονται σ' αυτά:
 - i) βιωσιμότητα
 - ii) λειτουργία φραγμού
 - iii) μορφολογία
 - iv) αναπαραγωγικότητα και προγνωστικότητα
 - v) ποιοτικούς έλεγχους του μοντέλου,
- λεπτομέρειες για την εφαρμοσθείσα διαδικασία δοκιμών,
- χρησιμοποιηθείσες δόσεις δοκιμής, διάρκεια της έκθεσης και της μετά την αγωγή επώασης,
- περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμής,

- παραπομπή σε ιστορικά δεδομένα για το μοντέλο. Τα εν λόγω δεδομένα πρέπει να περιλαμβάνουν τα ακόλουθα, χωρίς να περιορίζονται σ' αυτά:
 - i) αποδοχή των δεδομένων ποιοτικού ελέγχου σε σχέση με ιστορικά δεδομένα για τις παρτίδες
 - ii) αποδοχή των τιμών του θετικού και του αρνητικού μάρτυρα σε σχέση με τις μέσες τιμές και το εύρος τιμών που αφορούν τον θετικό και τον αρνητικό μάρτυρα,
- περιγραφή των χρησιμοποιηθέντων κριτηρίων αξιολόγησης, όπου συμπεριλαμβάνεται αιτιολόγηση της επιλογής της ή των τιμών διαχωρισμού για το προγνωστικό μοντέλο,
- παραπομπή σε ιστορικά δεδομένα για τους μάρτυρες.

Αποτελέσματα:

- πίνακας με τα δεδομένα από τις επιμέρους ελεγχόμενες χημικές ουσίες για κάθε μέτρηση και κάθε επανάληψη μέτρησης,
- αναφορά των χρησιμοποιηθέντων μαρτύρων για ελεγχόμενες χημικές ουσίες που είναι αναγωγικά της MTT και/ή έγχρωμες,
- περιγραφή άλλων παρατηρούμενων επιδράσεων.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπέρασμα

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, UN New York and Geneva. Διατίθεται στον ιστότοπο: [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. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (3) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 (ΕΕ L 353 της 31.12.2008, σ. 1).
- (4) OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<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. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<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. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<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. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<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)? Διατίθεται στον ιστότοπο: [<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. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001), A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, Results and evaluation by the Management Team, Toxicol. in Vitro 15, 57-93.
- (11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, Toxicol. in Vitro 16, 765-770.
- (12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004), Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests, ALTEX 21, 107-114.
- (13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests — An assessment of the performance of the optimised test, ATLA 33, 351-367.

- (14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005), The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, ATLA 33, 329-349.
- (15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002), Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task force report 2, ATLA 30, 109-129.
- (16) Spielmann, H., mailto:Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., mailto:Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test, ATLA 35, 559-601.
- (17) Hoffmann, S. (2006), ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1- α . Διατίθεται στον ιστότοπο: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, ATLA 35, 603-619.
- (19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonnaud, E. and Leclaire, J. (2007), *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy - Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, 14, 351-358.
- (20) EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<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. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<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. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html]
- (24) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004), *In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models, Toxicol. in Vitro 18, 231-243.
- (25) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65, 55-63.
- (26) EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min - 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (27) EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Διατίθεται στον ιστότοπο: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (28) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (29) Harvell, J.D., Lamminstusta, K., and Maibach, H.I. (1995), Irritant contact dermatitis, In: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.
- (30) Οδηγία 2001/59/ΕΚ της Επιτροπής, της 6ης Αυγούστου 2001, σχετικά με την προσαρμογή στην τεχνική πρόοδο, για εικοστή όγδοη φορά, της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ του Συμβουλίου περί προσεγγίσεως των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων που αφορούν στην ταξινόμηση, συσκευασία και επισήμανση των επικίνδυνων ουσιών (ΕΕ L 225 της 21.8.2001, σ. 1).
- (31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. and Robinson, M.K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. Contact Dermatitis 51, 1-4.

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

Προσάρτημα 1

Ορισμοί

Ορθότητα: η εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί μέτρο των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την “συμφωνία” για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (9).

Κυτταρική βιωσιμότητα: παράμετρος με την οποία μετράται η συνολική δραστηριότητα κυτταρικού πληθυσμού, π.χ. ως ικανότητα των κυτταρικών μιτοχονδριακών αφυδρογονασών να ανάγουν τη χρωστική ζωτικής χρώσης MTT [βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, μπλε του θειαζολυλίου], η οποία, ανάλογα με το μετρούμενο τελικό σημείο και τον χρησιμοποιούμενο σχεδιασμό δοκιμής, συσχετίζεται με τον συνολικό αριθμό και/ή τη ζωτικότητα των κυττάρων.

Συμφωνία: μέτρο των επιδόσεων των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την “ορθότητα” και ορίζεται ως το ποσοστό του συνόλου των ελεγχόμενων χημικών ουσιών που ταξινομούνται σωστά ως θετικές ή αρνητικές (9).

ET₅₀: η τιμή αυτή μπορεί να υπολογιστεί κατ’ εκτίμηση με τον προσδιορισμό του χρόνου έκθεσης που απαιτείται για να μειωθεί η κυτταρική βιωσιμότητα κατά 50 % μετά την εφαρμογή καθορισμένης συγκέντρωσης της ουσίας-δείκτη, βλ.επίσης IC₅₀.

CLP της ΕΕ [κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων]: κανονισμός με τον οποίο εφαρμόζεται στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) το σύστημα ταξινόμησης και επισήμανσης των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) (3).

GHS (Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemicals — Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα των Ηνωμένων Εθνών για την ταξινόμηση και επισήμανση των χημικών προϊόντων): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικών κινδύνων και κινδύνων για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα επικοινωνιακά στοιχεία, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, για τη μετάδοση πληροφοριών σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις των εν λόγω προϊόντων, με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (1).

IC₅₀: η τιμή αυτή μπορεί να υπολογιστεί κατ’ εκτίμηση με τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης στην οποία μια χημική ουσία-δείκτης μειώνει τη βιωσιμότητα των ιστών κατά 50 % μετά από καθορισμένο χρόνο έκθεσης, βλ.επίσης ET₅₀.

Άπειρη δόση: ποσότητα ελεγχόμενης χημικής ουσίας που εφαρμόζεται στην επιδερμίδα και υπερβαίνει την απαιτούμενη για την πλήρη και ομοιόμορφη κάλυψη της επιδερμικής επιφάνειας.

Δοκιμή *me-too*: έκφραση της καθομιλούμενης που παραπέμπει σε μέθοδο δοκιμών η οποία είναι δομικά και λειτουργικά ανάλογη με επικυρωμένη και εγκεκριμένη μέθοδο δοκιμών αναφοράς. Η εν λόγω μέθοδος δοκιμών προσφέρεται για ταχεία επικύρωση (catch-up validation). Ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την “παρεμφερή μέθοδο δοκιμών” (9).

Πρότυπα επιδόσεων: πρότυπα που βασίζονται σε επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και παρέχουν τη βάση για την αξιολόγηση της συγκρισιμότητας προτεινόμενης μεθόδου δοκιμών η οποία είναι μηχανιστικά και λειτουργικά παρεμφερής. Τα πρότυπα επιδόσεων περιλαμβάνουν i) βασικά συστατικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών, ii) κατάλογο ελάχιστων ουσιών αναφοράς, οι οποίες έχουν επιλεγεί μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απόδειξη των αποδεκτών επιδόσεων της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς και iii) τα συγκρίσιμα επίπεδα ορθότητας και αξιοπιστίας, που βασίζονται στα επιτευχθέντα για την επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και τα οποία πρέπει να επιδεικνύει η προτεινόμενη μέθοδος δοκιμών όταν αξιολογείται με χρήση του καταλόγου ελάχιστων ουσιών αναφοράς (9).

Χημικές ουσίες αναφοράς: χημικές ουσίες που επιλέγονται για να χρησιμοποιηθούν στη διαδικασία επικύρωσης και για τις οποίες είναι ήδη γνωστές οι αποκρίσεις στο σύστημα δοκιμών αναφοράς *in vitro* ή *in vivo* στο ζωικό είδος που ενδιαφέρει. Οι εν λόγω χημικές ουσίες πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικές, αφενός των τάξεων χημικών προϊόντων στις οποίες προβλέπεται ότι θα εφαρμόζεται η μέθοδος δοκιμών και, αφετέρου, του πλήρους φάσματος των αποκρίσεων —ισχυρή, ασθενής, αρνητική— που αναμένονται για τις χημικές ουσίες στις οποίες μπορεί να εφαρμοστεί η μέθοδος. Ενδέχεται να απαιτούνται διαφορετικές σειρές χημικών ουσιών αναφοράς για τα διάφορα στάδια της διαδικασίας επικύρωσης, καθώς και για τις διάφορες μεθόδους δοκιμών και χρήσεις των δοκιμών (9).

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της δοκιμής με την επίδραση που ενδιαφέρει και του κατά πόσον αυτή έχει σημασία και είναι χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμή μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση που ενδιαφέρει. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της μεθόδου δοκιμών (9).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (9).

Δοκιμή υποκατάστασης: δοκιμή που έχει σχεδιαστεί για να υποκαταστήσει δοκιμή χρησιμοποιούμενη στην καθημερινή πρακτική και αποδεκτή για τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας και/ή την εκτίμηση κινδύνου και η οποία, όπως έχει διαπιστωθεί, εξασφαλίζει ισοδύναμη ή βελτιωμένη προστασία της υγείας του ανθρώπου ή των ζώων ή του περιβάλλοντος, κατά περίπτωση, σε σύγκριση με την αποδεκτή δοκιμή, για όλες τις πιθανές περιπτώσεις δοκιμής και ελεγχόμενες χημικές ουσίες (9).

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών ελεγχόμενων χημικών ουσιών που ταξινομούνται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο της ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας μιας μεθόδου δοκιμών (9).

Δερματικός ερεθισμός: η πρόκληση αναστρέψιμων βλαβών στο δέρμα μετά την εφαρμογή ελεγχόμενης χημικής ουσίας για χρονικό διάστημα έως 4 ωρών. Ο δερματικός ερεθισμός είναι τοπική, μη ανοσογονική αντίδραση που εμφανίζεται σε σύντομο χρόνο μετά τη διέγερση (29). Το κύριο χαρακτηριστικό της είναι ο αναστρέψιμος χαρακτήρας της, ο οποίος συνεπάγεται φλεγμονώδεις αντιδράσεις και τα περισσότερα τυπικά κλινικά σημεία ερεθισμού (ερύθημα, οίδημα, κνησμό και πόνο) που συνδέονται με φλεγμονή.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών ελεγχόμενων χημικών ουσιών που ταξινομούνται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο της ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας μιας μεθόδου δοκιμών (9).

Στρατηγική κλιμακωτών δοκιμών: διεξαγωγή δοκιμών κατά την οποία οι μέθοδοι δοκιμών εφαρμόζονται διαδοχικά. Η απόφαση επίλογής μεθόδου σε κάθε επόμενο επίπεδο δοκιμής λαμβάνεται με βάση τα αποτελέσματα του προηγούμενου επιπέδου (9).

Ελεγχόμενη χημική ουσία (καλούμενη επίσης “ελεγχόμενη ουσία”): κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Προσάρτημα 2

Πρότυπα επιδόσεων για την αξιολόγηση προτεινόμενων παρεμφερών ή τροποποιημένων μεθόδων δοκιμών δερματικού ερεθισμού *in vitro* σε μοντέλο ανασυσταθείσας ανθρώπινης επιδερμίδας (RhE)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Σκοπός των προτύπων για τις επιδόσεις είναι να παρέχουν τη βάση με την οποία είναι δυνατόν να διαπιστωθεί ότι νέες μέθοδοι —αποκλειστικές (δηλαδή κατοχυρωμένες με δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, με εμπορικά σήματα, με καταχώριση) και μη— διαθέτουν επαρκή ορθότητα και αξιοπιστία για συγκεκριμένες δοκιμές. Τα εν λόγω πρότυπα επιδόσεων βασίζονται σε επικυρωμένες και εγκεκριμένες μεθόδους και μπορούν να χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της αξιοπιστίας και της ορθότητας άλλων ανάλογων μεθόδων (καλούνται κοινώς “δοκιμές me-too”), οι οποίες στηρίζονται σε παρεμφερείς επισημονικές αρχές και με τις οποίες μετράται ή προβλέπεται η ίδια βιολογική ή τοξική επίδραση (9).
2. Πριν από την υιοθέτηση τροποποιημένων μεθόδων, δηλαδή προτεινόμενων δυνητικών βελτιώσεων σε εγκεκριμένη μέθοδο, πρέπει να διενεργείται αξιολόγηση για να διαπιστωθούν οι επιδράσεις των προτεινόμενων αλλαγών στις επιδόσεις της δοκιμής και ο βαθμός στον οποίο οι εν λόγω αλλαγές επηρεάζουν τα στοιχεία που τροφοδοτούν τις υπόλοιπες συνιστώσες της διαδικασίας επικύρωσης. Ανάλογα με το πλήθος και το είδος των προτεινόμενων αλλαγών, τα δεδομένα που έχουν προκύψει και τα έγγραφα τεκμηρίωσης των εν λόγω αλλαγών, αυτές θα πρέπει να υποβάλλονται είτε στη διαδικασία επικύρωσης που περιγράφεται για τις νέες δοκιμές είτε, όπου ενδείκνυται, σε περιορισμένη εκτίμηση αξιοπιστίας και καταλληλότητας με τη βοήθεια καθιερωμένων προτύπων για τις επιδόσεις (9).
3. Οι παραλλαγές (me-too) ή τροποποιήσεις των τριών επικυρωμένων μεθόδων [μοντέλα RhE EpiSkin™ (επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς – VRM), EpiDerm™ SIT (EPI-200) και SkinEthic™] που προτείνεται να χρησιμοποιηθούν στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών πρέπει να αξιολογούνται για να διαπιστωθούν η αξιοπιστία και η ορθότητά τους, με τη χρήση χημικών ουσιών που αντιπροσωπεύουν την πλήρη βαθμολογική κλίμακα ερεθιστικότητας Draize. Οι τιμές αξιοπιστίας και ορθότητας που προκύπτουν για τις προτεινόμενες παρεμφερείς ή τροποποιημένες μεθόδους, όταν οι εν λόγω μέθοδοι αξιολογούνται με τη βοήθεια των 20 χημικών ουσιών αναφοράς που συνιστώνται στα πρότυπα επιδόσεων (πίνακας 1), πρέπει να είναι εφάμιλλες ή ανώτερες εκείνων της VRM (πίνακας 2) (2) (16). Οι τιμές αξιοπιστίας και ορθότητας που πρέπει να επιτυγχάνονται παρατίθενται στις παραγράφους 8 έως 12 του παρόντος προσαρτήματος. Περιλαμβάνονται χημικές ουσίες μη ταξινομούμενες (“Καμία κατηγορία” του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ) και ταξινομούμενες (κατηγορία 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ) (1), οι οποίες αντιπροσωπεύουν διαφορετικές τάξεις χημικών ουσιών, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση της αξιοπιστίας και της ορθότητας (ευαισθησία, ειδικότητα και συνολική ορθότητα) της προτεινόμενης μεθόδου με εκείνες της VRM. Πριν χρησιμοποιηθεί η μέθοδος για δοκιμές νέων ελεγχόμενων χημικών ουσιών, πρέπει να προσδιορίζεται η ικανότητά της να αναγνωρίζει σωστά τις ερεθιστικές χημικές ουσίες της κατηγορίας 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ και, ανάλογα με το κανονιστικό πλαίσιο για το οποίο προορίζονται τα δεδομένα, η ικανότητά της να χαρακτηρίζει σωστά τις χημικές ουσίες που δεν κατατάσσονται σε καμία κατηγορία βάσει του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ.

4. Τα παρόντα πρότυπα επιδόσεων βασίζονται στα πρότυπα του κέντρου ECVAM της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για τις επιδόσεις (8), τα οποία επικαιροποιήθηκαν σύμφωνα με τα συστήματα ταξινόμησης και επισήμανσης GHS των Ηνωμένων Εθνών και CLP της ΕΕ (1) (3). Τα αρχικά πρότυπα επιδόσεων είχαν καθοριστεί μετά την ολοκλήρωση της μελέτης επικύρωσης (21) και βασίζονταν στο ενωσιακό σύστημα ταξινόμησης που θεσπίστηκε με την οδηγία 2001/59/ΕΚ της Επιτροπής της 6ης Αυγούστου 2001 σχετικά με την προσαρμογή στην τεχνική πρόοδο, για εικοστή όγδοη φορά, της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ του Συμβουλίου περί προσεγγίσεως των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων που αφορούν στην ταξινόμηση, συσκευασία και επισήμανση των επικίνδυνων ουσιών⁽¹⁾. Λόγω της υιοθέτησης του συστήματος ταξινόμησης και επισήμανσης GHS των Ηνωμένων Εθνών από την ΕΕ (CLP της ΕΕ) (3), η οποία μεσολάβησε ανάμεσα στην ολοκλήρωση της μελέτης επικύρωσης και στην οριστικοποίηση της παρούσας μεθόδου δοκιμών, τα πρότυπα επιδόσεων επικαιροποιήθηκαν (8). Η επικαιροποίηση αυτή αφορά κυρίως αλλαγές i) στη σειρά των χημικών ουσιών αναφοράς των προτύπων για τις επιδόσεις και ii) στις καθορισμένες τιμές αξιοπιστίας και ορθότητας (2) (23).

ΠΡΟΤΥΠΑ ΕΠΙΔΟΣΕΩΝ ΓΙΑ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΔΕΡΜΑΤΙΚΟΥ ΕΡΕΘΙΣΜΟΥ IN VITRO ΣΕ RhE

5. Τα πρότυπα επιδόσεων συνίστανται από τα ακόλουθα τρία στοιχεία (9):

- I) Βασικά συστατικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών
- II) Κατάλογος ελάχιστων χημικών ουσιών αναφοράς
- III) Καθορισμένες τιμές αξιοπιστίας και ορθότητας

I) Βασικά συστατικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών

6. Πρόκειται για τα βασικά δομικά, λειτουργικά και διαδικαστικά στοιχεία μιας επικυρωμένης μεθόδου δοκιμών, τα οποία θα πρέπει να περιλαμβάνει το πρωτόκολλο της προτεινόμενης μεθόδου που είναι μηχανιστικά και λειτουργικά παρεμφερής ή τροποποιημένη. Στα εν λόγω συστατικά στοιχεία συγκαταλέγονται μοναδικά χαρακτηριστικά της μεθόδου, διαδικαστικές λεπτομέρειες κρίσιμης σημασίας και μέτρα ποιοτικού ελέγχου. Η τήρηση των βασικών συστατικών στοιχείων της μεθόδου δοκιμών συμβάλλει στο να εξασφαλίζεται ότι η προτεινόμενη παρεμφερής ή τροποποιημένη μέθοδος βασίζεται στις ίδιες θεωρητικές αρχές όπως η αντίστοιχη VRM (9). Τα βασικά συστατικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών περιγράφονται λεπτομερώς στις παραγράφους 16 έως 21 της παρούσας μεθόδου και οι δοκιμές πρέπει να διεξάγονται σύμφωνα με:

- τους γενικούς όρους (παράγραφος 16)
- τους λειτουργικούς όρους, οι οποίοι καλύπτουν τα εξής:
 - τη βιωσιμότητα (παράγραφος 17),
 - τη λειτουργία φραγμού (παράγραφος 18),
 - τη μορφολογία (παράγραφος 19),
 - την αναπαραγωγιμότητα (παράγραφος 20) και
 - τον ποιοτικό έλεγχο (παράγραφος 21).

II) Κατάλογος ελάχιστων χημικών ουσιών αναφοράς

7. Οι χημικές ουσίες αναφοράς χρησιμοποιούνται προκειμένου να κριθεί αν η αξιοπιστία και η ορθότητα μιας προτεινόμενης παρεμφερούς ή τροποποιημένης μεθόδου, η οποία είναι αποδεδειγμένα επαρκώς ομοειδής με τη VRM από δομικής και λειτουργικής πλευράς ή αποτελεί ήσοнос τροποποίηση μιας από τις τρεις επικυρωμένες μεθόδους, είναι συγκρίσιμες με εκείνες της VRM ή ανώτερες (2) (8) (16) (23). Στις 20 συνιστώμενες χημικές ουσίες αναφοράς του πίνακα 1 περιλαμβάνονται ουσίες που αντιπροσωπεύουν, αφενός, διαφορετικές τάξεις χημικών ουσιών (δηλαδή κατηγορίες που βασίζονται στις δραστικές ομάδες) και, αφετέρου, την πλήρη βαθμολογική κλίμακα ερεθιστικότητας Draize (από μη ερεθιστικό έως ισχυρό ερεθιστικό). Ο κατάλογος αυτός περιέχει 10 χημικές ουσίες της κατηγορίας 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ και 10 χημικές ουσίες που δεν κατατάσσονται σε καμία κατηγορία, από τις οποίες τρεις είναι ουσίες της προαιρετικής κατηγορίας 3 του GHS των Ηνωμένων Εθνών. Στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών, η προαιρετική κατηγορία 3 θεωρείται μη υφιστάμενη. Οι χημικές ουσίες του πίνακα 1 επιλέχθηκαν μεταξύ εκείνων οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν κατά το στάδιο βελτιστοποίησης που ακολούθησε την προεπικύρωση, καθώς και στη μελέτη επικύρωσης της VRM, σε σχέση με τη χημική λειτουργικότητα και τη φυσική κατάσταση (14) (18). Οι εν λόγω ουσίες αναφοράς συνιστούν τον ελάχιστο αριθμό χημικών ουσιών που πρέπει να χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της ορθότητας και της αξιοπιστίας μιας προτεινόμενης παρεμφερούς ή τροποποιημένης μεθόδου, αλλά δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη νέων μεθόδων. Σε περίπτωση που μια ουσία του καταλόγου δεν είναι διαθέσιμη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες ουσίες για τις οποίες υπάρχουν κατάλληλα δεδομένα αναφοράς από δοκιμές in vivo, επιλεγόμενες πρωτίστως μεταξύ των χημικών ουσιών οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν κατά το στάδιο βελτιστοποίησης που ακολούθησε την προεπικύρωση ή στη μελέτη επικύρωσης της VRM. Εφόσον κρίνεται σκόπιμο, για την περαιτέρω αξιολόγηση της ορθότητας της προτεινόμενης μεθόδου, επιτρέπεται να προστίθενται στον κατάλογο ελάχιστων χημικών ουσιών αναφοράς επιπλέον ουσίες που αντιπροσωπεύουν άλλες τάξεις χημικών προϊόντων και για τις οποίες υπάρχουν κατάλληλα δεδομένα αναφοράς από δοκιμές in vivo.

⁽¹⁾ ΕΕ L 225 της 21.8.2001, σ. 1.

Πίνακας 1

Κατάλογος ελάχιστων χημικών ουσιών αναφοράς για τον προσδιορισμό των τιμών ορθότητας και αξιοπιστίας παρεμφερών ή τροποποιημένων μεθόδων δοκιμών δερματικού ερεθισμού σε RhE ⁽¹⁾

Χημική ουσία	Αριθμός CAS	Φυσική κατάσταση	Βαθμολογία σε δοκιμές in vivo	Κατηγορία in vitro κατά τη VRM	Κατηγορία in vivo κατά το GHS των Ην. Εθνών/CLP της ΕΕ
1-βρωμο-4-χλωρο-βουτάνιο	6940-78-9	Υγρό	0	Κατηγορία 2	Καμία
φθαλικό διαιθύλιο	84-66-2	Υγρό	0	Καμία	Καμία
ναφθαλινοξικό οξύ	86-87-3	Στερεό	0	Καμία	Καμία
φαινοξυοξικό αλλύλιο	7493-74-5	Υγρό	0,3	Καμία	Καμία
ισοπροπανόλη	67-63-0	Υγρό	0,3	Καμία	Καμία
4-(μεθυλοθειο)-βενζαλδεύδη	3446-89-7	Υγρό	1	Κατηγορία 2	Καμία
στεατικό μεθύλιο	112-61-8	Στερεό	1	Καμία	Καμία
βουτυρικό επτύλιο	5870-93-9	Υγρό	1,7	Καμία	Καμία
σαλικυλικό εξύλιο	6259-76-3	Υγρό	2	Καμία	Καμία
κινναμωμάλδεύδη	104-55-2	Υγρό	2	Κατηγορία 2	Καμία (Προαιρετική κατηγορία 3) ⁽²⁾
δεκανόλη-1 ⁽²⁾	112-30-1	Υγρό	2,3	Κατηγορία 2	Κατηγορία 2
κυκλαμιναλδεύδη	103-95-7	Υγρό	2,3	Κατηγορία 2	Κατηγορία 2
1-βρωμοεξάνιο	111-25-1	Υγρό	2,7	Κατηγορία 2	Κατηγορία 2
Υδροχλωρική 2-χλωρομεθυλο-3,5-διμεθυλο-4-μεθοξυ-πυριδίνη	86604-75-3	Στερεό	2,7	Κατηγορία 2	Κατηγορία 2
δι-κ-προπυλο-δισουλφίδιο ⁽²⁾	629-19-6	Υγρό	3	Καμία	Κατηγορία 2
υδροξείδιο του καλίου (υδατικό διάλυμα 5 %)	1310-58-3	Υγρό	3	Κατηγορία 2	Κατηγορία 2
5-(1,1-διμεθυλαιθύλιο)-2- μεθυλο-βενζολοθειόλη	7340-90-1	Υγρό	3,3	Κατηγορία 2	Κατηγορία 2
1-μεθυλο-3-φαινυλο-1-πιπεραζίνη	5271-27-2	Στερεό	3,3	Κατηγορία 2	Κατηγορία 2
επτανάλη	111-71-7	Υγρό	3,4	Κατηγορία 2	Κατηγορία 2
Τετραχλωροαιθυλένιο	127-18-4	Υγρό	4	Κατηγορία 2	Κατηγορία 2

⁽¹⁾ Η επιλογή των χημικών ουσιών βασίζεται στα ακόλουθα κριτήρια: i) οι χημικές ουσίες κυκλοφορούν στο εμπόριο, ii) αντιπροσωπεύουν την πλήρη βαθμολογική κλίμακα ερεθιστικότητας Draize (από μη ερεθιστικό έως ισχυρό ερεθιστικό), iii) έχουν σαφώς καθορισμένη χημική δομή, iv) είναι αντιπροσωπευτικές της χημικής λειτουργικότητας που χρησιμοποιήθηκε στη διαδικασία επικύρωσης και v) δεν τους αποδίδονται άκρως τοξικά χαρακτηριστικά (π.χ. καρκινογόνες ή τοξικές για το αναπαραγωγικό σύστημα) και το κόστος διάθεσης των αποβλήτων τους δεν θεωρείται απαγορευτικό.

⁽²⁾ Χημικές ουσίες ερεθιστικές για το κουνέλι, οι οποίες όμως, σύμφωνα με αξιόπιστα διαθέσιμα στοιχεία, δεν είναι ερεθιστικές για τον άνθρωπο (31) (32) (33).

⁽³⁾ Στο GHS των Ηνωμένων Εθνών αλλά όχι στο CLP της ΕΕ.

III) Καθορισμένες τιμές αξιοπιστίας και ορθότητας

8. Για τη διαπίστωση της αξιοπιστίας και της ορθότητας των προτεινόμενων παρεμφερών ή τροποποιημένων μεθόδων που προορίζονται για μεταφορά μεταξύ εργαστηρίων, πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή, σε τρία τουλάχιστον εργαστήρια, και οι 20 χημικές ουσίες αναφοράς του πίνακα 1. Εάν όμως η προτεινόμενη μέθοδος πρόκειται να χρησιμοποιείται μόνο σε ένα εργαστήριο, δεν απαιτείται πολυεργαστηριακή δοκιμή για την επικύρωση. Ωστόσο, έχει θεμελιώδη σημασία η ανεξάρτητη αξιολόγηση των εν λόγω μελετών επικύρωσης από διεθνώς αναγνωρισμένους οργανισμούς επικύρωσης, σύμφωνα με διεθνείς κατευθυντήριες γραμμές (9). Κάθε εργαστήριο πρέπει να υποβάλλει σε δοκιμή και τις 20 χημικές ουσίες αναφοράς, εκτελώντας τρεις χωριστές μετρήσεις με διαφορετικές παρτίδες ιστού και με επαρκή χρονική απόσταση μεταξύ τους. Κάθε μέτρηση πρέπει να συνίσταται στην ταυτόχρονη δοκιμή τριών τουλάχιστον πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού για κάθε ελεγχόμενη ουσία, θετικό μάρτυρα και αρνητικό μάρτυρα που συμπεριλαμβάνονται σε αυτή.
9. Οι τιμές αξιοπιστίας και ορθότητας της προτεινόμενης μεθόδου πρέπει να υπολογίζονται με συνεκτίμηση και των τεσσάρων κατωτέρω κριτηρίων, τα οποία εξασφαλίζουν τον υπολογισμό των τιμών αξιοπιστίας και καταλληλότητας με προκαθορισμένο και σταθερό τρόπο:
 1. Μόνο τα δεδομένα από μετρήσεις πλήρων σειρών μετρήσεων πληρούν τις προϋποθέσεις για τον υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και διεργαστηριακής μεταβλητότητας της μεθόδου και της προγνωστικής της ικανότητας (ορθότητα).
 2. Κάθε συμμετέχον εργαστήριο πρέπει να καταλήγει στην τελική ταξινόμηση κάθε χημικής ουσίας αναφοράς χρησιμοποιώντας τη μέση τιμή βιωσιμότητας που προκύπτει από τις διάφορες μετρήσεις μιας πλήρους σειράς μετρήσεων.
 3. Μόνο τα δεδομένα που προκύπτουν για χημικές ουσίες για τις οποίες οι σειρές μετρήσεων είναι πλήρεις σε όλα τα συμμετέχοντα εργαστήρια πληρούν τις προϋποθέσεις για τον υπολογισμό της διεργαστηριακής μεταβλητότητας της μεθόδου.
 4. Οι τιμές ορθότητας πρέπει να υπολογίζονται με βάση τις προβλέψεις των διαφόρων συμμετεχόντων εργαστηρίων για καθεμία από τις 20 χημικές ουσίες αναφοράς.

Στο πλαίσιο αυτό, μια **σειρά μετρήσεων** αποτελείται από τρεις χωριστές μετρήσεις που εκτελεί ένα εργαστήριο για μια ελεγχόμενη χημική ουσία. **Πλήρης σειρά μετρήσεων** είναι η σειρά μετρήσεων ενός εργαστηρίου για μία ελεγχόμενη χημική ουσία, της οποίας και οι τρεις μετρήσεις είναι έγκυρες. Αυτό συνεπάγεται ότι κάθε άκυρη μέτρηση ακυρώνει ολόκληρη τη σειρά των τριών μετρήσεων.

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

10. Από την εκτίμηση της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας πρέπει να προκύπτει συμφωνία μεγαλύτερη ή ίση με (\geq) 90 % μεταξύ των ταξινομήσεων (κατηγορία 2 και καμία κατηγορία του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ) τις οποίες είχαν ως αποτέλεσμα οι διαφορετικές ανεξάρτητες μετρήσεις με τις 20 χημικές ουσίες αναφοράς στο ίδιο εργαστήριο.

Διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

11. Η εκτίμηση της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας δεν είναι απαραίτητη εάν η προτεινόμενη μέθοδος πρόκειται να χρησιμοποιηθεί μόνο σε ένα εργαστήριο. Για τη μεταφορά μεθόδου μεταξύ εργαστηρίων, η συμφωνία μεταξύ των ταξινομήσεων (κατηγορία 2 και "καμία κατηγορία" του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ) τις οποίες είχαν ως αποτέλεσμα οι διαφορετικές ανεξάρτητες μετρήσεις με τις 20 χημικές ουσίες αναφοράς τουλάχιστον σε τρία, κατά προτίμηση, εργαστήρια πρέπει να είναι μεγαλύτερη ή ίση με (\geq) 80 %.

Προγνωστική ικανότητα (ορθότητα)

12. Η ορθότητα (ευαισθησία, ειδικότητα και συνολική ορθότητα) της προτεινόμενης παρεμφερούς ή τροποποιημένης μεθόδου πρέπει να είναι συγκρίσιμη με εκείνη της VRM ή ανώτερη, λαμβανομένων υπόψη συμπληρωματικών πληροφοριών σχετικά με την καταλληλότητα για το είδος που ενδιαφέρει (πίνακας 2). Η ευαισθησία πρέπει να είναι μεγαλύτερη ή ίση με (\geq) 80 % (2) (8) (23). Ωστόσο, για την ευαισθησία της προτεινόμενης μεθόδου in vitro ισχύει ο πρόσθετος ειδικός περιορισμός ότι επιτρέπεται η εσφαλμένη ταξινόμηση μόνο δύο χημικών ουσιών της κατηγορίας 2 in vivo —δεκανόλη-1 και δι-κ-προπυλο-δισουλφίδιο— ως "Καμία κατηγορία" από περισσότερα του ενός συμμετέχοντα εργαστήρια. Η ειδικότητα πρέπει να είναι μεγαλύτερη ή ίση με (\geq) 70 % (2) (8) (23). Δεν ισχύει άλλος περιορισμός για την ειδικότητα της προτεινόμενης μεθόδου in vitro, δηλαδή επιτρέπεται η εσφαλμένη ταξινόμηση οποιασδήποτε χημικής ουσίας που δεν κατατάσσεται σε καμία κατηγορία in vivo από οποιοδήποτε συμμετέχον εργαστήριο, εφόσον η τελική ειδικότητα της μεθόδου δοκιμών παραμένει εντός του αποδεκτού εύρους τιμών. Η συνολική ορθότητα πρέπει να είναι μεγαλύτερη ή ίση με (\geq) 75 % (2) (8) (23). Παρόλο που η ευαισθησία της VRM, η οποία έχει υπολογιστεί για τις 20 χημικές ουσίες αναφοράς του πίνακα 1, ισούται με 90 %, η απαιτούμενη ελάχιστη τιμή ευαισθησίας για να θεωρηθεί έγκυρη μια παρεμφερής ή τροποποιημένη μέθοδος καθορίζεται σε 80 %, επειδή είναι γνωστό ότι τόσο η δεκανόλη-1 (χημική ουσία οριακού αποτελέσματος), όσο και το δι-κ-προπυλο-δισουλφίδιο (ψευδαρνητικό αποτέλεσμα με τη VRM) δεν είναι ερεθιστικές για τον άνθρωπο (31) (32) (33), αν και έχουν χαρακτηριστεί ερεθιστικές με τη δοκιμή σε κουνέλια. Δεδομένου ότι τα μοντέλα RhE βασίζονται σε ανθρώπινα κύτταρα, μπορεί να χαρακτηρίσουν μη ερεθιστικές τις συγκεκριμένες χημικές ουσίες ("Καμία κατηγορία" του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ).

Πίνακας 2

Απαιτούμενες προγνωστικές τιμές ευαισθησίας, ειδικότητας και συνολικής ορθότητας για να θεωρηθεί έγκυρη μια παρεμφερής ή τροποποιημένη μέθοδος

Ευαισθησία	Ειδικότητα	Συνολική ορθότητα
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Κριτήρια αποδοχής της μελέτης

13. Μία ή περισσότερες δοκιμές με μία ή περισσότερες ελεγχόμενες ουσίες είναι πιθανόν να μην πληρούν τα κριτήρια αποδοχής της δοκιμής για την ελεγχόμενη ουσία και τους μάρτυρες και/ή να μην είναι αποδεκτές για άλλους λόγους. Για τη συμπλήρωση κενών στα δεδομένα, μπορούν να επιτραπούν δύο επιπλέον δοκιμές κατ' ανώτατο όριο για κάθε ελεγχόμενη χημική ουσία ("επαναδοκιμή"). Για την ακρίβεια, καθώς επιβάλλεται ο ταυτόχρονος έλεγχος και θετικού και αρνητικού μάρτυρα σε περίπτωση επαναδοκιμής, επιτρέπεται η εκτέλεση δύο επιπλέον μετρήσεων κατ' ανώτατο όριο για κάθε ελεγχόμενη χημική ουσία.

14. Θεωρητικά, ακόμη και μετά από επαναδοκιμή, είναι δυνατόν να μην επιτύχει κάθε συμμετέχον εργαστήριο, για όλες τις χημικές ουσίες αναφοράς, τον απαιτούμενο ελάχιστο αριθμό τριών έγκυρων μετρήσεων ανά ελεγχόμενη χημική ουσία, με αποτέλεσμα να είναι ελλιπής ο πίνακας δεδομένων. Στις περιπτώσεις αυτές, για να θεωρηθούν αποδεκτές οι σειρές δεδομένων, πρέπει να πληρούνται σωρευτικά τα ακόλουθα τρία κριτήρια:

1. Πρέπει να υπάρχει τουλάχιστον μία πλήρης σειρά μετρήσεων και για τις 20 χημικές ουσίες αναφοράς.
2. Σε καθένα από τα τρία συμμετέχοντα εργαστήρια, τουλάχιστον το 85 % των σειρών μετρήσεων πρέπει να είναι πλήρεις (δηλαδή, για 20 ουσίες, επιτρέπονται 3 άκυρες σειρές μετρήσεων ανά εργαστήριο).
3. Τουλάχιστον το 90 % του συνόλου των δυνατών σειρών μετρήσεων σε τρία τουλάχιστον εργαστήρια πρέπει να είναι πλήρεις (δηλαδή, για 20 χημικές ουσίες που υποβλήθηκαν σε δοκιμή σε τρία εργαστήρια, επιτρέπονται συνολικά 6 άκυρες σειρές μετρήσεων).»

3. Προστίθενται τα ακόλουθα κεφάλαια:

«B.49. ΔΟΚΙΜΗ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ IN VITRO

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η δοκιμασία μικροπυρήνων in vitro (MNvit) αποτελεί δοκιμή γονιδιοτοξικότητας για την ανίχνευση μικροπυρήνων στο κυτταρόπλασμα των μεσοφασικών κυττάρων. Οι μικροπυρήνες μπορεί να προέρχονται από άκεντρα (δηλαδή χωρίς κεντρομερίδιο) τμήματα χρωμοσώματος ή από ολόκληρα χρωμοσώματα που δεν είναι ικανά να μετακινηθούν προς τους πόλους κατά το στάδιο ανάφασης της κυτταρικής διαίρεσης. Με τη δοκιμασία ανιχνεύεται η δράση κλαστογόνων και ανευπλοειδογόνων χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) (1) (2) σε κύτταρα που διαιρέθηκαν κατά τη διάρκεια της έκθεσης στην ελεγχόμενη ουσία ή μετά από αυτή. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών παρέχει τη δυνατότητα χρήσης πρωτοκόλλου με ή χωρίς τον αναστολέα πολυμερισμού της ακτίνης κυτταροχλασίνη (κυτοχλασίνη) B (cytoB). Η προσθήκη cytoB πριν από τη στοχευόμενη μίτωση επιτρέπει τον προσδιορισμό και την επιλεκτική ανάλυση της συχνότητας σχηματισμού μικροπυρήνων σε κύτταρα που έχουν ολοκληρώσει μία μίτωση, καθώς τα κύτταρα αυτά είναι διπύρνα (3) (4). Η παρούσα μέθοδος παρέχει επίσης τη δυνατότητα χρήσης πρωτοκόλλων χωρίς αναστολή της κυτταροκίνησης, με την προϋπόθεση ότι υπάρχουν στοιχεία από τα οποία προκύπτει ότι ο αναλυόμενος κυτταρικός πληθυσμός έχει υποστεί μίτωση.
2. Εκτός από τη χρήση της δοκιμασίας MNvit για την αναγνώριση χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) που επάγουν μικροπυρήνες, πληροφορίες σχετικά με τους μηχανισμούς πρόκλησης χρωμοσωματικών βλαβών και σχηματισμού μικροπυρήνων είναι επίσης δυνατόν να συγκεντρωθούν με αναστολή της κυτταροκίνησης, ανοσοχημική σήμανση κινητοχώρου ή με υβριδισμό με ανιχνευτές κεντρομεριδίου/τελομεριδίου (FISH, από τα αρχικά των λέξεων fluorescence in situ hybridisation/υβριδισμός in situ με φθορισμό) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Οι διαδικασίες σήμανσης και υβριδισμού μπορούν να χρησιμοποιούνται όταν αυξάνεται ο σχηματισμός μικροπυρήνων και ο ερευνητής επιθυμεί να διαπιστώσει αν η αύξηση οφείλεται σε κλαστογόνα και/ή ανευπλοειδογόνα συμβάντα.
3. Οι μικροπυρήνες αποτελούν βλάβη που μεταβιβάζεται στα θυγατρικά κύτταρα, ενώ οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες που καταγράφονται σε μεταφασικά κύτταρα είναι δυνατόν να μη μεταβιβάζονται. Λόγω της δυνατότητας σχετικά αντικειμενικής εκτίμησης των μικροπυρήνων σε μεσοφασικά κύτταρα, το εργαστηριακό προσωπικό πρέπει μόνο να διαπιστώνει αν τα κύτταρα έχουν ή όχι διαιρευθεί και πόσα κύτταρα περιέχουν μικροπυρήνα. Συνεπώς, είναι δυνατή η σχετικά ταχεία καταμέτρηση των παρασκευασμάτων και η αυτοματοποίηση της ανάλυσης. Αυτό καθιστά πρακτικά εφικτή την καταμέτρηση χιλιάδων αντί εκατοντάδων κυττάρων ανά αγωγή, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ισχύς της δοκιμασίας. Τέλος, επειδή μικροπυρήνες μπορούν να προκύψουν από καθυστερούντα χρωμοσώματα, παρέχεται η δυνατότητα ανίχνευσης παραγόντων που επάγουν ανευπλοειδία και οι οποίοι είναι δύσκολο να μελετηθούν με συμβατικές δοκιμές χρωμοσωματικών ανωμαλιών, π.χ. με την κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 473 (κεφάλαιο B.10 του παρόντος παραρτήματος) (17). Ωστόσο, με τη δοκιμασία MNvit δεν είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ των χημικών ουσιών που επάγουν πολυπλοειδία και των κλαστογόνων ουσιών, χωρίς τη χρήση ειδικών τεχνικών, όπως η FISH που περιγράφεται στην παράγραφο 2.

4. Η δοκιμασία MNvit είναι μέθοδος *in vitro*, στην οποία χρησιμοποιούνται συνήθως καλλιεργημένα κύτταρα ανθρώπου ή τρωκτικών. Παρέχει εκτεταμένη βάση για την *in vitro* διερεύνηση του δυναμικού πρόκλησης χρωμοσωματικών βλαβών, χάρη στη δυνατότητα ανίχνευσης τόσο των ανευπλοειδογόνων όσο και των κλαστογόνων ουσιών.
5. Η δοκιμασία MNvit είναι αυτοδύναμη και αποτελεσματική σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, παρουσία ή μη cytoB. Εκτενή δεδομένα υποστηρίζουν την εγκυρότητα της δοκιμασίας MNvit με τη χρήση διαφόρων κυτταρικών σειρών τρωκτικών (CHO, V79, CHL/IU και L5178Y) και ανθρώπινων λεμφοκυττάρων (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται, ειδικότερα, οι διεθνείς μελέτες επικύρωσης που συντόνισε η γαλλική επιστημονική εταιρεία Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22) και οι εκθέσεις του International Workshop on Genotoxicity Testing (4) (16). Τα διαθέσιμα δεδομένα επαναξιολογήθηκαν επίσης στο πλαίσιο μελέτης αναδρομικής επικύρωσης με ανάλυση βάρους της μαρτυρίας, η οποία διεξήχθη από το Ευρωπαϊκό Κέντρο Επικύρωσης Εναλλακτικών Μεθόδων (ECVAM) της Ευρωπαϊκής Επιτροπής, και η μέθοδος δοκιμών κρίθηκε επιστημονικά έγκυρη από την επιστημονική συμβουλευτική επιτροπή (ESAC) του ECVAM (32) (33) (34). Έχει επίσης περιγραφεί η χρήση της σειράς ανθρώπινων λεμφοβλαστοειδών κυττάρων TK6 (35), των κυττάρων HepG2 (36) (37) και πρωτογενών εμβρυϊκών κυττάρων του είδους χάμστερ *Mesocricetus auratus* cells (38), τα οποία όμως δεν έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες επικύρωσης.

ΟΡΙΣΜΟΙ

6. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

7. Οι δοκιμές που διεξάγονται *in vitro* απαιτούν κατά κανόνα τη χρήση εξωγενούς πηγής μεταβολικής ενεργοποίησης, εκτός εάν τα κύτταρα διαθέτουν ικανότητα μεταβολισμού των ελεγχόμενων ουσιών. Τα εξωγενή συστήματα μεταβολικής ενεργοποίησης δεν μιμούνται απόλυτα τις συνθήκες *in vivo*. Πρέπει επίσης να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η χρήση συνθηκών που μπορεί να οδηγήσουν σε τεχνητά θετικά αποτελέσματα, τα οποία μπορεί να μην οφείλονται σε εγγενή μεταλλαξιογένεση αλλά σε παράγοντες όπως η σημαντική αλλαγή του pH ή της οσμωτικότητας ή τα υψηλά επίπεδα κυτταροτοξικότητας (39) (40) (41). Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία μεταβάλλει το pH του θρεπτικού υλικού όταν προστίθεται σε αυτό, το pH πρέπει να ρυθμίζεται, κατά προτίμηση με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος στο διάλυμα παρακαταθήκης κατά τρόπο ώστε όλοι οι όγκοι να παραμένουν αμετάβλητοι σε όλες τις συγκεντρώσεις δοκιμής και για όλους τους μάρτυρες.
8. Βασικής σημασίας για την ανάλυση της επαγωγής μικροπυρήνων είναι να συντελείται μίτωση τόσο στις καλλιέργειες που υποβάλλονται σε αγωγή, όσο και σε εκείνες που δεν υποβάλλονται. Το πιο διαφωτιστικό στάδιο για την καταμέτρηση των μικροπυρήνων είναι η ολοκλήρωση μιας μίτωσης των κυττάρων κατά τη διάρκεια της αγωγής με την ελεγχόμενη ουσία ή μετά από αυτή.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

9. Καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων ή κυττάρων θηλαστικών εκτίθενται στην ελεγχόμενη χημική ουσία, με και χωρίς εξωγενή πηγή μεταβολικής ενεργοποίησης, εκτός εάν χρησιμοποιούνται κύτταρα με επαρκή μεταβολική ικανότητα. Σε όλες τις δοκιμές συμπεριλαμβάνονται χημικές ουσίες ως παράλληλοι μάρτυρες φορέα/διαλύτη και θετικοί μάρτυρες.
10. Κατά τη διάρκεια της έκθεσης στην ελεγχόμενη ουσία ή μετά από αυτή, τα κύτταρα καλλιεργούνται για επαρκές χρονικό διάστημα ώστε η βλάβη του χρωμοσώματος ή της ατράκτου να προκαλέσει τον σχηματισμό μικροπυρήνων σε μεσοφασικά κύτταρα. Για την επαγωγή ανευπλοειδίας χρειάζεται συνήθως η παρουσία της ελεγχόμενης ουσίας κατά τη μίτωση. Τα μεσοφασικά κύτταρα συλλέγονται και, ύστερα από χρώση, αναλύονται για να διαπιστωθεί η παρουσία μικροπυρήνων. Στην ιδανική περίπτωση, θα πρέπει να καταμετρώνται μόνο μικροπυρήνες κυττάρων τα οποία ολοκλήρωσαν μια μίτωση κατά τη διάρκεια της έκθεσης στην ελεγχόμενη ουσία ή της περιόδου μετά την έκθεση, εάν προβλέπεται. Στις καλλιέργειες που υποβάλλονται σε αγωγή με αναστολέα κυτταροκίνησης, αυτό επιτυγχάνεται με την καταμέτρηση μόνο των διπύρηνων κυττάρων. Εάν δεν χρησιμοποιείται αναστολέας κυτταροκίνησης, έχει σημασία να καταδεικνύεται ότι τα αναλυόμενα κύτταρα πιθανώς διαρρέθηκαν κατά τη διάρκεια της έκθεσης στην ελεγχόμενη ουσία ή μετά από αυτή. Για όλα τα πρωτόκολλα, έχει σημασία να καταδεικνύεται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων τόσο στις καλλιέργειες-μάρτυρες όσο και σε εκείνες που υποβάλλονται σε αγωγή, στις δε καλλιέργειες στις οποίες καταμετρώνται οι μικροπυρήνες (ή σε παράλληλες καλλιέργειες) πρέπει να εκτιμάται ο βαθμός κυτταροτοξικότητας ή κυτταρόστασης που επάγει η ελεγχόμενη ουσία.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Προετοιμασία

11. Μπορούν να χρησιμοποιούνται καλλιεργημένα πρωτογενή ανθρώπινα λεμφοκύτταρα περιφερειακού αίματος (5) (19) (42) (43) και ορισμένες κυτταρικές σειρές τρωκτικών, όπως οι CHO, V79, CHL/IU και L5178Y (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Η χρήση άλλων κυτταρικών σειρών και τύπων πρέπει να αιτιολογείται με βάση τις αποδεδειγμένες επιδόσεις τους στη δοκιμασία, όπως περιγράφεται στην ενότητα "Κριτήρια αποδοχής". Δεδομένου ότι η συχνότητα υποβάθρου του σχηματισμού μικροπυρήνων επηρεάζει την ευαισθησία της δοκιμασίας, συνιστάται η χρήση κυτταρικών τύπων με χαμηλή και σταθερή συχνότητα υποβάθρου όσον αφορά τον σχηματισμό μικροπυρήνων.

12. Τα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα περιφερειακού αίματος πρέπει να λαμβάνονται από νέα (ηλικίας 18-35 ετών περίπου) και υγιή άτομα που δεν καπνίζουν και δεν έχουν γνωστό ιστορικό πρόσφατης έκθεσης σε γονιδιοτοξικές χημικές ουσίες ή σε ακτινοβολία. Σε περίπτωση συνένωσης για χρήση κυττάρων από περισσότερους του ενός δότες, πρέπει να προσδιορίζεται ο αριθμός των δοτών. Η συχνότητα σχηματισμού μικροκυρήνων αυξάνεται με την ηλικία, περισσότερο στις γυναίκες απ' ό,τι στους άνδρες (44), γεγονός που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στην επιλογή δοτών κυττάρων για συνένωση.

Θρεπτικά υλικά και συνθήκες καλλιέργειας

13. Για τις καλλιέργειες πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλο θρεπτικό υλικό και κατάλληλες συνθήκες επώασης (δοχεία καλλιέργειας, συγκέντρωση CO₂, θερμοκρασία και υγρασία). Οι καθιερωμένες κυτταρικές σειρές και στελέχη πρέπει να ελέγχονται τακτικά ως προς τη σταθερότητα του τυπικού αριθμού χρωμοσωμάτων και την απουσία μόλυνσης από μυκόπλασμα και να μην χρησιμοποιούνται εάν έχει μεταβληθεί ο τυπικός αριθμός χρωμοσωμάτων. Πρέπει να είναι γνωστή η κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου στις συνθήκες καλλιέργειας που χρησιμοποιεί το εργαστήριο δοκιμών. Εάν εφαρμόζεται η μέθοδος αναστολής της κυτταροκίνησης, η συγκέντρωση του αναστολέα κυτταροκίνησης πρέπει να βελτιστοποιείται για τον συγκεκριμένο τύπο κυττάρων και να έχει αποδεδειγμένα ικανοποιητική απόδοση σε διπύρηνα κύτταρα για καταμέτρηση.

Παρασκευή των καλλιεριγίων

14. Καθιερωμένες κυτταρικές σειρές και στελέχη: τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται από μητρικές καλλιέργειες, ανακαλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό, σε πυκνότητα τέτοια ώστε οι καλλιέργειες να μη γίνονται συρρέουσες σε μονοστιβάδα και οι καλλιέργειες σε εναιώρημα να μην φθάνουν σε κατάσταση υπέρμετρης πυκνότητας πριν από τον χρόνο συλλογής, και επωάζονται στους 37 °C.
15. Λεμφοκύτταρα: ολικό (πλήρες) αίμα κατεργασμένο με αντιθρομβωτικό (π.χ. ηπαρίνη) ή διαχωρισμένα λεμφοκύτταρα καλλιεργούνται παρουσία μιτωγόνου (π.χ. φυτοαιμοσυγκολλητίνη/PHA) πριν εκτεθούν στην ελεγχόμενη ουσία και στην cytoB.

Μεταβολική ενεργοποίηση

16. Όταν χρησιμοποιούνται κύτταρα με ανεπαρκή ενδογενή μεταβολική ικανότητα, πρέπει να χρησιμοποιούνται εξωγενή συστήματα μεταβολικής ενεργοποίησης. Το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο σύστημα είναι ένα μεταμιτοχονδριακό κλάσμα εμπλουτισμένο με συμπάργοντα (S9), το οποίο παρασκευάζεται από το ήπαρ τρωκτικών που έχει υποβληθεί σε κατεργασία με ενζυμοεπαγωγικούς παράγοντες, όπως το Aroclor 1254 (45) (46) ή ο συνδυασμός φαινοβαρβιτόνης και β-ναφθοφλαβόνης (46) (47) (48) (49). Ο συνδυασμός αυτός δεν αντιβαίνει στη σύμβαση της Στοκχόλμης για τους έμμοιους οργανικούς ρύπους (50) και στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 850/2004 για τους έμμοιους οργανικούς ρύπους (66), ενώ έχει αποδειχθεί εξίσου αποτελεσματικός με το Aroclor 1254 στην επαγωγή οξειδωσών μεικτής λειτουργίας (46) (47) (48) (49). Το κλάσμα S9 χρησιμοποιείται συνήθως σε συγκεντρώσεις 1-10 % v/v στο τελικό μέσο θρεπτικό υλικό δοκιμής. Ο όρος που αφορά το σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης ενδέχεται να εξαρτάται από την τάξη της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και, σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να ενδείκνυται η χρήση περισσότερων της μιας συγκεντρώσεων του S9.
17. Οι κυτταρικές σειρές που είναι προϊόν γενετικής μηχανικής και εκφράζουν συγκεκριμένα ενεργοποιητικά ένζυμα του ανθρώπου ή των τρωκτικών μπορούν να καταργήσουν την ανάγκη για εξωγενές σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης και να χρησιμοποιηθούν ως κύτταρα δοκιμής. Στην περίπτωση αυτή, η επιλογή των χρησιμοποιούμενων κυτταρικών σειρών πρέπει να αιτιολογείται επιστημονικά, π.χ. με βάση την καταλληλότητα των οξειδωσών μεικτής λειτουργίας για τον μεταβολισμό της ελεγχόμενης ουσίας (51) και τον βαθμό απόκρισης τους σε γνωστές κλαστογόνες και ανευπλοειδογόνες ουσίες (βλέπε χωριστή ενότητα για τα κριτήρια αποδοχής). Επισημαίνεται ότι η ελεγχόμενη ουσία μπορεί να μη μεταβολίζεται από την ή τις εκφραζόμενες οξειδάσες μεικτής λειτουργίας. Στην περίπτωση αυτή, τα αρνητικά αποτελέσματα δεν υποδηλώνουν ότι η ελεγχόμενη ουσία δεν μπορεί να επάγει τον σχηματισμό μικροκυρήνων.

Παρασκεύασμα της ελεγχόμενης ουσίας

18. Πριν από την αγωγή των κυττάρων, οι στερεές χημικές ουσίες πρέπει να διαλύονται σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς και να αραιώνονται, εφόσον ενδείκνυται. Οι υγρές ουσίες μπορούν να προστίθενται κατευθείαν στα συστήματα δοκιμής και/ή να αραιώνονται πριν από την αγωγή. Οι αέριες ή πτηνικές ουσίες πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή με κατάλληλες τροποποιήσεις των τυπικών πρωτοκόλλων, π.χ. αγωγή σε σφραγισμένα δοχεία (52) (53). Πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της ελεγχόμενης ουσίας, εκτός εάν η φύλαξή τους είναι αποδεκτή βάσει των σχετικών με τη σταθερότητα στοιχείων.

Συνθήκες δοκιμής

Διαλύτες/φορείς

19. Ο διαλύτης/φορέας δεν πρέπει να αντιδρά με την ελεγχόμενη ουσία ούτε να είναι ασύμβατος με την επιβίωση των κυττάρων ή τη διατήρηση της δραστηριότητας του S9 στη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση. Η χρήση άλλων διαλυτών/φορέων εκτός από τους καθιερωμένους (π.χ. νερό, θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας, διμεθυλοσουλφοξείδιο) πρέπει να υποστηρίζεται από δεδομένα από τα οποία προκύπτει ότι είναι συμβατοί με την ελεγχόμενη ουσία και δεν είναι γονιδιοτοξικοί. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατόν, να εξετάζεται πρώτα η δυνατότητα χρήσης υδατικού διαλύτη/φορέα.

Χρήση cytoB ως αναστολέα κυτταροκίνησης

20. Μια από τις σημαντικότερες παραμέτρους κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας MNvit είναι να εξασφαλίζεται ότι τα καταμετρούμενα κύτταρα ολοκλήρωσαν μια μίτωση κατά τη διάρκεια της αγωγής με την ελεγχόμενη ουσία ή της περιόδου επώασης μετά την αγωγή, εάν προβλέπεται. Η CytoB είναι ο ευρύτερα χρησιμοποιούμενος παράγοντας για την αναστολή της κυτταροκίνησης, καθώς αναστέλλει τη συγκρότηση της ακτίνης και, κατ' επέκταση, εμποδίζει τον αποχωρισμό των θυγατρικών κυττάρων μετά τη μίτωση, προκαλώντας τον σχηματισμό διπύρηνων κυττάρων (5) (54) (55). Ως εκ τούτου η καταμέτρηση των μικροπυρήνων μπορεί να περιοριστεί μόνο στα κύτταρα που υπέστησαν μίτωση κατά τη διάρκεια της αγωγής ή μετά από αυτή. Είναι δυνατόν να μετρηθεί ταυτόχρονα η επίδραση της ελεγχόμενης ουσίας στην κινητική του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Όταν χρησιμοποιούνται ανθρώπινα λεμφοκύτταρα, πρέπει να χρησιμοποιείται CytoB ως αναστολέας κυτταροκίνησης, λόγω της μεταβλητότητας της διάρκειας του κυτταρικού κύκλου εντός των καλλιιεργειών και μεταξύ των δοτών, καθώς και του γεγονότος ότι δεν αντιδρούν όλα τα λεμφοκύτταρα στην ΡΗΑ. Στις δοκιμές με κυτταρικές σειρές έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλες μέθοδοι για τη διαπίστωση της διαίρεσης των καταμετρούμενων κυττάρων, οι οποίες εξετάζονται κατωτέρω (βλέπε παράγραφο 26).
21. Το εργαστήριο πρέπει να καθορίζει, για κάθε τύπο κυττάρων, την κατάλληλη συγκέντρωση cytoB για την επίτευξη της βέλτιστης συχνότητας διπύρηνων κυττάρων στις καλλιέργειες-μάρτυρες με φορέα/διαλύτη. Η κατάλληλη συγκέντρωση cytoB κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 3 and 6 µg/ml.

Μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταροτοξικότητας και επιλογή των συγκεντρώσεων έκθεσης

22. Κατά τον καθορισμό της υψηλότερης συγκέντρωσης δοκιμής της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να αποφεύγονται οι συγκεντρώσεις που μπορούν να οδηγήσουν σε τεχνητά θετικές αποκρίσεις, όπως εκείνες που προκαλούν υπέρμετρη κυτταροτοξικότητα, καθίζηση στο θρεπτικό υλικό και σημαντική αλλαγή του pH ή της ωσμωτικότητας (39) (40) (41).
23. Μετράται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός για να εξασφαλίζεται ότι τα υποβαλλόμενα σε αγωγή κύτταρα υφίστανται μίτωση κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας και ότι η αγωγή διεξάγεται σε κατάλληλα επίπεδα κυτταροτοξικότητας (βλέπε παράγραφο 29). Στα κύτταρα που χρειάζονται μεταβολική ενεργοποίηση, η κυτταροτοξικότητα πρέπει να προσδιορίζεται με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, μέσω της σχετικής αύξησης του καταμετρούμενου αριθμού κυττάρων (RICC) ή του σχετικού διπλασιασμού του πληθυσμού (RPD) (βλέπε μαθηματικούς τύπους στο προσάρτημα 2), εκτός εάν χρησιμοποιείται cytoB. Εφόσον χρησιμοποιείται cytoB, η κυτταροτοξικότητα μπορεί να προσδιορίζεται μέσω του δείκτη αναδιπλασιασμού (RI) (βλέπε μαθηματικό τύπο στο προσάρτημα 2).
24. Η κατεργασία των καλλιιεργειών με cytoB και η μέτρηση της σχετικής συχνότητας των μονοπύρηνων, διπύρηνων και πολυπύρηνων κυττάρων στην καλλιέργεια παρέχουν μια ορθή μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού της επίδρασης της αγωγής στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και της κυτταροτοξικής ή κυτταροστατικής δράσης της (5) και εξασφαλίζουν την καταμέτρηση μόνο των κυττάρων εκείνων που διαιρέθηκαν κατά τη διάρκεια της αγωγής ή μετά από αυτή.
25. Στις μελέτες με cytoB, η κυτταρόσταση/κυτταροτοξικότητα είναι δυνατόν να προσδιοριστεί ποσοτικά μέσω του δείκτη πολλαπλασιασμού με αναστολή κυτταροκίνησης (CBPI) (5), (26), (56) ή να συναχθεί από τον δείκτη RI, από 500 τουλάχιστον κύτταρα ανά καλλιέργεια (βλέπε μαθηματικούς τύπους στο προσάρτημα 2). Όταν χρησιμοποιείται cytoB για την εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ο δείκτης CBPI ή RI πρέπει να προσδιορίζεται από 500 τουλάχιστον κύτταρα ανά καλλιέργεια. Οι μετρήσεις αυτές, μεταξύ άλλων, μπορούν να χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας με τη σύγκριση των τιμών που αντιστοιχούν στις καλλιέργειες αγωγής και στις καλλιέργειες-μάρτυρες. Η αξιολόγηση άλλων δεικτών κυτταροτοξικότητας (π.χ. συρρέουσα καλλιέργεια, κυτταρικός αριθμός, απόπτωση, νέκρωση, καταμέτρηση μετάφασης) μπορεί να παράσχει χρήσιμες πληροφορίες.
26. Στις μελέτες χωρίς cytoB, είναι αναγκαίο να καταδεικνύεται ότι τα καταμετρούμενα κύτταρα της καλλιέργειας διαιρέθηκαν κατά τη διάρκεια της αγωγής με την ελεγχόμενη ουσία ή μετά από αυτή. Σε αντίθετη περίπτωση, υπάρχει το ενδεχόμενο ψευδαρνητικών αποκρίσεων. Μεταξύ των μεθόδων που έχουν χρησιμοποιηθεί για την εξασφάλιση της καταμέτρησης διαιρεθέντων κυττάρων συγκαταλέγονται η ενσωμάτωση και, στη συνέχεια, η ανίχνευση βρωμοδεοξυουριδίνης (BrdU) με σκοπό την αναγνώριση των κυττάρων που έχουν αναδιπλασιαστεί (57), η κλωνοποίηση στις περιπτώσεις αγωγής και καταμέτρησης *in situ*, σε αντικειμενοφόρο πλάκα, κυττάρων από μόνιμες κυτταρικές σειρές [δείκτης πολλαπλασιασμού (PI)] (25) (26) (27) (28), η μέτρηση του σχετικού διπλασιασμού του πληθυσμού (RPD) ή της σχετικής αύξησης του καταμετρούμενου αριθμού κυττάρων (RICC) και άλλες αποδεδειγμένες μέθοδοι (16) (56) (58) (59) (βλέπε μαθηματικούς τύπους στο προσάρτημα 2). Η αξιολόγηση άλλων δεικτών κυτταροτοξικότητας ή κυτταρόστασης (π.χ. συρρέουσα καλλιέργεια, κυτταρικός αριθμός, απόπτωση, νέκρωση, καταμέτρηση μετάφασης) μπορεί να παράσχει χρήσιμες πληροφορίες.
27. Θα πρέπει να αξιολογούνται τρεις τουλάχιστον συγκεντρώσεις δοκιμής που επιδέχονται ανάλυση. Για να επιτευχθεί αυτό, μπορεί να είναι απαραίτητη η εκτέλεση του πειράματος με μεγαλύτερο πλήθος συγκεντρώσεων που δεν απέχουν πολύ μεταξύ τους και η ανάλυση του σχηματισμού μικροπυρήνων στις συγκεντρώσεις που παρέχουν το κατάλληλο φάσμα κυτταροτοξικότητας. Εναλλακτική στρατηγική είναι η διεξαγωγή προκαταρκτικής δοκιμής κυτταροτοξικότητας για τον περιορισμό του εύρους συγκεντρώσεων της τελικής δοκιμής.
28. Με την υψηλότερη συγκέντρωση πρέπει να επιδιώκεται κυτταροτοξικότητα $55 \pm 5\%$. Σε υψηλότερα επίπεδα, η κυτταροτοξικότητα ενδέχεται να έχει ως δευτερογενές αποτέλεσμα χρωμοσωματικές βλάβες (60). Σε περίπτωση κυτταροτοξικότητας, οι επιλεγόμενες συγκεντρώσεις δοκιμής πρέπει να εκτείνονται από τη συγκέντρωση που προκαλεί κυτταροτοξικότητα $55 \pm 5\%$ μέχρι εκείνη που προκαλεί ελάχιστη ή μηδενική κυτταροτοξικότητα.

29. Εάν δεν παρατηρηθεί κυτταροτοξικότητα ή ίζημα, η υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής πρέπει να αντιστοιχεί στη μικρότερη από τις τιμές 0,01 M, 5 mg/mL ή 5 μl/mL. Κατά κανόνα, η απόσταση μεταξύ των επιλεγόμενων για ανάλυση συγκεντρώσεων πρέπει να μην υπερβαίνει τον παράγοντα 10. Προκειμένου για ουσίες με μεγάλη κλίση καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης, μπορεί να είναι απαραίτητη η ελάττωση της απόστασης μεταξύ των συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας, ώστε να γίνεται καταμέτρηση και στις καλλιέργειες των κλιμάκων μεσαίας και χαμηλής τοξικότητας.
30. Όταν η διαλυτότητα αποτελεί περιοριστικό παράγοντα, η υψηλότερη συγκέντρωση, εφόσον δεν περιορίζεται από την κυτταροτοξικότητα, πρέπει να είναι η μικρότερη συγκέντρωση στην οποία οι καλλιέργειες παρουσιάζουν το ελάχιστο ορατό ίζημα, με την προϋπόθεση να μην παρεμποδίζεται η καταμέτρηση. Η καθίζηση πρέπει να αξιολογείται με μεθόδους όπως η οπτική μικροσκοπία, ενώ πρέπει να καταγράφεται το ίζημα που εμμένει ή εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (το αργότερο στο τέλος της αγωγής).

Μάρτυρες

31. Σε κάθε πείραμα πρέπει να περιλαμβάνονται παράλληλοι θετικοί μάρτυρες και μάρτυρες διαλύτη/φορέα, με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση.
32. Οι θετικοί μάρτυρες χρειάζονται για να καταδεικνύεται η ικανότητα αναγνώρισης των κλαστογόνων και των ανευπλοειδογόνων ουσιών από τα χρησιμοποιούμενα κύτταρα και από το πρωτόκολλο δοκιμής και για να επιβεβαιώνεται η μεταβολική ικανότητα του παρασκευάσματος S9. Οι θετικοί μάρτυρες πρέπει, εφόσον, να είναι ουσίες που είναι γνωστό ότι επάγουν τον σχηματισμό μικροσπυρήνων σε συγκεντρώσεις οι οποίες αναμένεται να οδηγήσουν σε μικρές αλλά αναπαραγώγιμες αυξήσεις έναντι της τιμής υποβάθρου και, αφετέρου, να καταδεικνύουν την ευαισθησία του συστήματος δοκιμής. Οι συγκεντρώσεις των θετικών μαρτύρων πρέπει να επιλέγονται κατά τρόπο ώστε τα αποτελέσματα να είναι σαφή, αλλά να μην αποκαλύπτουν αμέσως την ταυτότητα των κωδικοποιημένων αντικειμενοφόρων πλακών στον παρατηρητή.
33. Για να καταδειχθεί τόσο η μεταβολική ικανότητα όσο και η ικανότητα του συστήματος δοκιμής να ανιχνεύει τις κλαστογόνες χημικές ουσίες, πρέπει να χρησιμοποιείται κλαστογόνος ουσία που απαιτεί μεταβολική ενεργοποίηση (π.χ. κυκλοφωσφamide, βενζο[α]πυρενίνο). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι θετικοί μάρτυρες, αυτό όμως πρέπει να αιτιολογείται. Δεδομένου ότι ορισμένοι θετικοί μάρτυρες που χρειάζονται μεταβολική ενεργοποίηση ενδέχεται να είναι ενεργοί, χωρίς εξωγενή μεταβολική ενεργοποίηση, σε ορισμένες συνθήκες αγωγής ή για ορισμένες κυτταρικές σειρές, η ανάγκη μεταβολικής ενεργοποίησης και η δραστικότητα του παρασκευάσματος S9 πρέπει να ελέγχονται με την κυτταρική σειρά και στις συγκεντρώσεις που έχουν επιλεγεί.
34. Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν ανευπλοειδογόνες ουσίες για τις οποίες να είναι γνωστό ότι απαιτείται μεταβολική ενεργοποίηση προκειμένου να έχουν γονιδιοτοξική δράση (16). Παραδείγματα αποδεκτών, επί του παρόντος, θετικών μαρτύρων ανευπλοειδογόνου δράσης είναι η κολχικίνη και η βινβλαστίνη. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι θετικοί μάρτυρες, εφόσον επάγουν τον σχηματισμό μικροσπυρήνων αποκλειστικά ή πρωτίστως με ανευπλοειδογόνο δράση. Για να μην χρειάζονται δύο θετικοί μάρτυρες χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση (ένας για την κλαστογένεση και ένας για την ανευπλοειδογένεση), ο μάρτυρας ανευπλοειδογένεσης μπορεί να λειτουργήσει ως θετικός μάρτυρας χωρίς S9, ενώ ο μάρτυρας κλαστογένεσης μπορεί να χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της επάρκειας του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης. Στην περίπτωση των κυττάρων που δεν απαιτούν S9 πρέπει να χρησιμοποιούνται θετικοί μάρτυρες, τόσο για την κλαστογένεση όσο και για την ανευπλοειδογένεση. Οι συνιστώμενοι θετικοί μάρτυρες περιλαμβάνονται στο προσάρτημα 3.
35. Μπορεί να εξετάζεται η χρήση θετικών μαρτύρων παρόμοιας χημικής τάξης, εφόσον υπάρχουν κατάλληλες ουσίες. Όλοι οι χρησιμοποιούμενοι θετικοί μάρτυρες πρέπει να είναι οι ενδεδειγμένοι για τον τύπο των κυττάρων και τις συνθήκες ενεργοποίησης.
36. Για κάθε χρόνο συλλογής πρέπει να συμπεριλαμβάνονται μάρτυρες διαλύτη/φορέα. Επιπλέον, πρέπει να χρησιμοποιούνται και αρνητικοί μάρτυρες (χωρίς διαλύτη/φορέα) που δεν υποβάλλονται σε αγωγή, εκτός εάν υπάρχουν δημοσιευμένα δεδομένα ή ιστορικά δεδομένα του εργαστηρίου που καταδεικνύουν ότι ο επιλεγμένος διαλύτης δεν έχει γονιδιοτοξικές ή άλλες επιβλαβείς επιδράσεις στις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

Πρόγραμμα αγωγής

37. Για τη μεγιστοποίηση της πιθανότητας ανίχνευσης μιας ανευπλοειδογόνου ή κλαστογόνου ουσίας που δρα σε συγκεκριμένο στάδιο του κυτταρικού κύκλου, έχει μεγάλη σημασία η αγωγή επαρκών αριθμών κυττάρων με την ελεγχόμενη ουσία σε όλα τα στάδια του κύκλου τους. Συνεπώς, το πρόγραμμα αγωγής των κυτταρικών σειρών και των καλλιέργειών πρωτογενών κυττάρων μπορεί να διαφέρει ως έναν βαθμό από εκείνο των λεμφοκυττάρων, τα οποία χρειάζονται μτωγόνο διέγερση για να αρχίσουν τον κύκλο τους. Το θέμα αυτό εξετάζεται στις παραγράφους 41 έως 43 (16).
38. Θεωρητικές εκτιμήσεις, σε συνδυασμό με δημοσιευμένα δεδομένα (18), παρέχουν ενδείξεις σύμφωνα με τις οποίες οι περισσότερες ανευπλοειδογόνες και κλαστογόνες ουσίες ανιχνεύονται με βραχύχρονη αγωγή 3 έως 6 ωρών, με και χωρίς S9, ακολουθούμενη από απομάκρυνση της ελεγχόμενης ουσίας και φάση ανάπτυξης 1,5-2,0 κυτταρικών κύκλων (6). Λαμβάνονται δείγματα κυττάρων σε χρόνο 1,5 έως 2,0 φορές μεγαλύτερο από την κανονική διάρκεια (δηλαδή χωρίς αγωγή) του κυτταρικού κύκλου, είτε μετά την έναρξη της αγωγής είτε στο τέλος της (βλέπε πίνακα 1). Οι χρόνοι δειγματοληψίας ή αποκατάστασης είναι δυνατόν να παραταθούν, εάν είναι γνωστό ή υπάρχουν υπόνοιες ότι η ελεγχόμενη ουσία επηρεάζει τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (π.χ. στις δοκιμές ουσιών ανάλυσης με νουκλεοζίτες).

39. Λόγω της δυνητικής τοξικότητας των παρασκευασμάτων S9 για τα καλλιεργημένα κύτταρα θηλαστικών, η αγωγή με παρατεταμένη έκθεση επί 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου εφαρμόζεται μόνο χωρίς S9. Στην παρατεταμένη αγωγή παρέχεται η δυνατότητα επιλογής μεταξύ της αγωγής των κυττάρων με την ελεγχόμενη χημική ουσία με ή χωρίς cytoB. Με αυτή τη δυνατότητα επιλογής αντιμετωπίζονται οι περιπτώσεις προβληματισμού σχετικά με τις πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ελεγχόμενης ουσίας και της cytoB.
40. Τα συνιστώμενα προγράμματα αγωγής κυττάρων εμφανίζονται στον πίνακα 1. Τα γενικά αυτά προγράμματα αγωγής μπορούν να τροποποιούνται ανάλογα με τη σταθερότητα και τη δραστικότητα της ελεγχόμενης ουσίας ή με τα ιδιαίτερα αυξητικά χαρακτηριστικά των χρησιμοποιούμενων κυττάρων. Κάθε αγωγή πρέπει να αρχίζει και να τελειώνει όταν τα κύτταρα βρίσκονται στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Τα εν λόγω προγράμματα αναλύονται στις επόμενες παραγράφους 41-47.

Πίνακας 1

Χρόνοι αγωγής και συλλογής κυττάρων για τη δοκιμασία MNvit

Λεμφοκύτταρα, πρωτογενή κύτταρα και κυτταρικές σειρές που υποβάλλονται σε αγωγή με cytoB	+ S9	Αγωγή επί 3-6 ώρες παρουσία S9, απομάκρυνση του S9 και του θρεπτικού υλικού αγωγής, προσθήκη νέου θρεπτικού υλικού και cytoB, συλλογή μετά παρέλευση χρόνου ίσου με 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου
	- S9 Σύντομη έκθεση	Αγωγή επί 3-6 ώρες, απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού αγωγής, προσθήκη νέου θρεπτικού υλικού και cytoB, συλλογή μετά παρέλευση χρόνου ίσου με 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου
	- S9 Παρατεταμένη έκθεση	Επιλογή Α: Αγωγή επί 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου παρουσία cytoB, συλλογή στο τέλος της περιόδου έκθεσης Επιλογή Β: Αγωγή επί 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, απομάκρυνση της ελεγχόμενης ουσίας, προσθήκη νέου θρεπτικού υλικού και cytoB, συλλογή μετά παρέλευση χρόνου ίσου με 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου

Κυτταρικές σειρές που υποβάλλονται σε αγωγή χωρίς cytoB
(Τα προγράμματα αγωγής που παρατίθενται ανωτέρω, με τη διαφορά ότι δεν προστίθεται cytoB.)

Λεμφοκύτταρα, πρωτογενή κύτταρα και κυτταρικές σειρές με cytoB

41. Η αποτελεσματικότερη προσέγγιση για τα λεμφοκύτταρα συνίσταται στην έναρξη της έκθεσης στην ελεγχόμενη ουσία 44-48 ώρες μετά τη διέγερση με ΡΗΑ, όταν έχει παύσει ο συγχρονισμός του κύκλου (5). Στην αρχική δοκιμή, τα κύτταρα υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία επί 3-6 ώρες, με και χωρίς S9. Το θρεπτικό υλικό αγωγής απομακρύνεται και αντικαθίσταται από νέο υλικό που περιέχει cytoB και τα κύτταρα συλλέγονται μετά παρέλευση χρόνου ίσου με 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.
42. Εάν τα αποτελέσματα και των δύο αρχικών δοκιμών με σύντομη έκθεση (3-6 ώρες) είναι αρνητικά ή αμφίβολα, ακολουθεί αγωγή παρατεταμένης έκθεσης χωρίς S9. Παρέχονται δύο εναλλακτικές δυνατότητες αγωγής, οι οποίες είναι εξίσου αποδεκτές. Ωστόσο, για τα διεγερμένα λεμφοκύτταρα, η λογαριθμική ανάπτυξη των οποίων ενδέχεται να είναι μειωμένη μετά την πάροδο 96 ωρών από τη διέγερση, μπορεί να ενδείκνυται περισσότερο η επιλογή Α. Επίσης, στην επιλογή Β, οι κυτταροκαλλιέργειες δεν πρέπει να είναι συρρέουσες κατά τον χρόνο της τελικής δειγματοληψίας.
- Επιλογή Α: Τα κύτταρα υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία επί 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και συλλέγονται στο τέλος της περιόδου αγωγής.
- Επιλογή Β: Τα κύτταρα υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία επί 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Το θρεπτικό υλικό αγωγής απομακρύνεται και αντικαθίσταται από νέο υλικό και τα κύτταρα συλλέγονται μετά από επιπλέον χρόνο ίσο με 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.
43. Τα πρωτογενή κύτταρα και οι κυτταρικές σειρές πρέπει να υποβάλλονται σε αγωγή με τρόπο παρόμοιο με των λεμφοκυττάρων, με τη διαφορά ότι δεν είναι απαραίτητη η διέγερσή τους με ΡΗΑ επί 44-48 ώρες. Τα άλλα κύτταρα πλην των λεμφοκυττάρων πρέπει να εκτίθενται κατά τρόπο ώστε να βρίσκονται ακόμη στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης κατά τον χρόνο τερματισμού της μελέτης.

Κυτταρικές σειρές χωρίς cytoB

44. Τα κύτταρα πρέπει να υποβάλλονται σε αγωγή επί 3-6 ώρες, με και χωρίς S9. Το θρεπτικό υλικό αγωγής απομακρύνεται και αντικαθίσταται από νέο υλικό και τα κύτταρα συλλέγονται μετά παρέλευση χρόνου ίσου με 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.
45. Εάν τα αποτελέσματα και των δύο αρχικών δοκιμών με σύντομη έκθεση (3-6 ώρες) είναι αρνητικά ή αμφίβολα, ακολουθεί αγωγή παρατεταμένης έκθεσης (χωρίς S9). Παρέχονται δύο εναλλακτικές δυνατότητες αγωγής, οι οποίες είναι εξίσου αποδεκτές.
- Επιλογή Α: Τα κύτταρα υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία επί 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και συλλέγονται στο τέλος της περιόδου αγωγής.
 - Επιλογή Β: Τα κύτταρα υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία επί 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Το θρεπτικό υλικό αγωγής απομακρύνεται και αντικαθίσταται από νέο υλικό και τα κύτταρα συλλέγονται μετά από επιπλέον χρόνο ίσο με 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.
46. Στο τέλος της περιόδου αγωγής των 3-6 ωρών είναι πιθανή η παρουσία μιτωτικών κυττάρων (αναγνωρίζονται από το στρογγυλό σχήμα τους και από την απόσπασή τους από την επιφάνεια) στις μονοστιβάδες. Επειδή τα εν λόγω μιτωτικά κύτταρα αποσπώνται εύκολα, είναι πιθανή η απώλειά τους κατά την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού που περιέχει την ελεγχόμενη ουσία. Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για τη συλλογή τους κατά την έκπλυση των καλλιιεργειών και την επαναφορά τους σε αυτές, ώστε να αποφεύγεται η απώλεια κυττάρων που υφίστανται μίτωση κατά τον χρόνο της συλλογής και διατρέχουν κίνδυνο σχηματισμού μικροπυρήνων.

Αριθμός καλλιιεργειών

47. Πρέπει να χρησιμοποιείται διπλή καλλιιεργεία για κάθε συγκέντρωση ελεγχόμενης ουσίας, καθώς και για τους μάρτυρες φορέα/διαλύτη και τους αρνητικούς. Εφόσον είναι δυνατόν να αποδειχθεί, με βάση ιστορικά δεδομένα του εργαστηρίου, ότι η μεταβλητότητα μεταξύ των δύο καλλιιεργειών είναι ελάχιστη, μπορεί να γίνει δεκτή η χρήση μιας μόνο καλλιιεργείας. Σε περίπτωση χρήσης μιας μόνο καλλιιεργείας, συνιστάται να αυξάνεται το πλήθος των συγκεντρώσεων της ανάλυσης.

Συλλογή των κυττάρων και ετοιμασία των αντικειμενοφόρων πλακών

48. Η συλλογή και η επεξεργασία των κυττάρων πραγματοποιούνται σε κάθε καλλιιεργεία χωριστά. Η ετοιμασία των κυτταρικών παρασκευασμάτων μπορεί να περιλαμβάνει κατεργασία με υπότονο διάλυμα. Ωστόσο, το στάδιο αυτό δεν είναι απαραίτητο, εάν επιτυγχάνεται κατάλληλη επίστρωση των κυττάρων με άλλον τρόπο. Μπορούν να χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές ετοιμασίας αντικειμενοφόρων πλακών, με την προϋπόθεση ότι προκύπτουν υψηλής ποιότητας κυτταρικά παρασκευάσματα για καταμέτρηση. Το κυτταρόπλασμα πρέπει να διατηρείται ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση των μικροπυρήνων και (στη μέθοδο αναστολής της κυτταροκίνησης) η αξιόπιστη αναγνώριση των διπύρηνων κυττάρων.
49. Για τη χρώση των αντικειμενοφόρων πλακών μπορούν να χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι, όπως η χρωστική Giemsa ή ειδικά για το DNA φθοριοχρώματα (59). Με τη χρήση ειδικής για το DNA χρώσης [π.χ. πορτοκαλί της ακριδίνης (61) ή Hoechst 33258 και πυρονίνη-Y (62)] είναι δυνατόν να εξαλειφθούν ορισμένα από τα τεχνητά αποτελέσματα που οφείλονται στη χρήση μη ειδικών για το DNA χρώσεων. Εάν ενδιαφέρει να συγκεντρωθούν στοιχεία σχετικά με τον μηχανισμό του σχηματισμού μικροπυρήνων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντισώματα κινητοχώρου, η μέθοδος FISH με παγκεντρομερικούς ανιχνευτές DNA ή η σήμανση *in situ* (PRINS) με παγκεντρομερικούς εκκνητές, σε συνδυασμό με κατάλληλη για DNA χρώση αντίθεσης, για την αναγνώριση του περιεχομένου των μικροπυρήνων (ακέραιο χρωμόσωμα/ τμήμα χρωμοσώματος) (15) (16). Μπορούν να χρησιμοποιούνται και άλλες μέθοδοι διάκρισης μεταξύ κλαστογόνων και ανευπλοειδογόνων ουσιών, εάν έχει αποδειχθεί η αποτελεσματικότητά τους.

Ανάλυση

50. Όλες οι αντικειμενοφόρες πλάκες, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που αντιστοιχούν στον φορέα/διαλύτη και στους μάρτυρες, πρέπει να λαμβάνουν ανεξάρτητο κωδικό πριν από τη μικροσκοπική εξέταση. Εναλλακτικά, είναι δυνατή η ανάλυση των κωδικοποιημένων δειγμάτων με αυτόματο σύστημα κυτταρομετρίας ροής ή ανάλυσης εικόνων.
51. Στις κατεργασμένες με cytoB καλλιιεργείες, η συχνότητα σχηματισμού μικροπυρήνων πρέπει να εξετάζεται τουλάχιστον σε 2 000 διπύρηνια κύτταρα ανά συγκέντρωση (τουλάχιστον 1 000 διπύρηνια κύτταρα ανά καλλιιεργεία, δύο καλλιιεργείες ανά συγκέντρωση). Εάν χρησιμοποιείται μόνο μία καλλιιεργεία, πρέπει να καταμετρώνται από αυτή τουλάχιστον 2 000 διπύρηνια κύτταρα ανά συγκέντρωση. Εάν σε κάθε συγκέντρωση είναι διαθέσιμα για καταμέτρηση σημαντικά λιγότερα από 1 000 διπύρηνια κύτταρα ανά καλλιιεργεία (ή 2 000, σε περίπτωση χρήσης μόνο μιας καλλιιεργείας) και δεν διαπιστωθεί σημαντική αύξηση των μικροπυρήνων, η δοκιμή πρέπει να επαναληφθεί με περισσότερα κύτταρα ή με λιγότερο τοξικές συγκεντρώσεις, αναλόγως του ποιο από τα δύο ενδείκνυται. Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην καταμετρώνται διπύρηνια κύτταρα που έχουν ανώμαλο σχήμα ή των οποίων οι δύο πυρήνες παρουσιάζουν μεγάλη διαφορά μεγέθους. Επίσης, δεν πρέπει να συγχέονται τα διπύρηνια κύτταρα με ελλειπώς επιστρωμένα πολυπύρηνια. Τα κύτταρα που περιέχουν περισσότερους από δύο κύριους πυρήνες δεν πρέπει να εξετάζονται για την παρουσία μικροπυρήνων, δεδομένου ότι η βασική συχνότητα σχηματισμού μικροπυρήνων μπορεί να είναι υψηλότερη σε αυτά (63) (64). Η καταμέτρηση μονοπύρηνων κυττάρων είναι αποδεκτή, εάν έχει αποδειχθεί ότι η ελεγχόμενη ουσία δεν παρεμποδίζει τη δράση της cytoB.

52. Στις κυτταρικές σειρές που υποβάλλονται στη δοκιμασία χωρίς κατεργασία με cytoB, πρέπει να καταμετρώνται οι μικροπυρήνες τουλάχιστον σε 2 000 διπύρηνια κύτταρα ανά συγκέντρωση (τουλάχιστον 1 000 κύτταρα ανά καλλιέργεια, δύο καλλιέργειες ανά συγκέντρωση). Σε περίπτωση χρήσης μόνο μιας καλλιέργειας ανά συγκέντρωση, πρέπει να καταμετρώνται από αυτή τουλάχιστον 2 000 κύτταρα.
53. Όταν χρησιμοποιείται cytoB, πρέπει να προσδιορίζεται ο δείκτης CBPI ή RI, τουλάχιστον από 500 κύτταρα ανά καλλιέργεια, για την εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (βλέπε προσάρτημα 2). Στις περιπτώσεις αγωγής χωρίς cytoB, είναι θεμελιώδους σημασίας η παροχή στοιχείων από τα οποία προκύπτει ο πολλαπλασιασμός των καταμετρούμενων κυττάρων, όπως εξηγείται στις παραγράφους 24-27.

Κριτήρια αποδοχής

54. Το εργαστήριο που προτείνει τη χρήση της δοκιμασίας MNvit η οποία περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών πρέπει να αποδεικνύει την ικανότητά του να ανιχνεύει, με αξιοπιστία και ορθότητα, χημικές ουσίες γνωστής ανευπλοειδογόνου και κλαστογόνου δράσης, με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, καθώς και γνωστές αρνητικές χημικές ουσίες, χρησιμοποιώντας τις χημικές ουσίες αναφοράς που παρατίθενται στο προσάρτημα 3. Προκειμένου να αποδείξει την οικεία ικανότητα ορθής εφαρμογής της παρούσας μεθόδου δοκιμών, το εργαστήριο πρέπει να παρέχει στοιχεία από τα οποία προκύπτει ότι, εάν η δοκιμή διεξάγεται χωρίς τη χρήση cytoB, τα κύτταρα που καταμετρώνται για σχηματισμό μικροπυρήνων έχουν ολοκληρώσει μία πυρηνική διαίρεση.
55. Συνιστάται η χρήση των χημικών ουσιών του προσαρτήματος 3 ως ουσιών αναφοράς. Μπορούν να συμπεριλαμβάνονται υποκατάστατα αυτών ή συμπληρωματικές χημικές ουσίες, εάν η δραστηριότητά τους είναι γνωστή, εάν επάγουν μικροπυρήνες με τους ίδιους μηχανισμούς δράσης και εάν είναι αποδεδειγμένα συναφείς με τις χημικές ουσίες που θα υποβάλλονται σε δοκιμή με τη διαδικασία MNvit. Η σχετική αιτιολόγηση μπορεί να περιλαμβάνει μελέτη επικύρωσης στην οποία χρησιμοποιήθηκε ευρύ φάσμα ουσιών ή η οποία επικεντρώθηκε σε στενότερο φάσμα, με βάση τη χημική τάξη της ελεγχόμενης ουσίας ή τον μελετώμενο μηχανισμό πρόκλησης βλάβης.
56. Για τους μάρτυρες φορέα/διαλύτη και τις καλλιέργειες που δεν υποβάλλονται σε αγωγή πρέπει να προκύπτουν αναπαραγώγιμες χαμηλές και σταθερές συχνότητες σχηματισμού μικροπυρήνων (συνήθως 5-25 μικροπυρήνες ανά 1 000 κύτταρα για τους τύπους κυττάρων που προσδιορίζονται στην παράγραφο 11). Άλλοι τύποι κυττάρων ενδέχεται να εμφανίζουν διαφορετικά φάσματα αποκρίσεων, τα οποία πρέπει να προσδιορίζονται κατά την επικύρωση της χρήσης των εν λόγω τύπων στη δοκιμασία MNvit. Τα δεδομένα από τους αρνητικούς και τους θετικούς μάρτυρες, καθώς και από τους μάρτυρες διαλύτη πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό ιστορικών πεδίων τιμών για τους μάρτυρες. Η απόφαση σχετικά με τη σκοπιμότητα της χρήσης παράλληλου θετικού/αρνητικού μάρτυρα σε ένα πείραμα πρέπει να βασίζεται στις τιμές αυτές.
57. Εάν προτείνονται μικρές τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου της δοκιμασίας (π.χ. χρήση αυτόματων τεχνικών καταμέτρησης αντί των μη αυτόματων, χρήση νέου τύπου κυττάρων), πρέπει να καταδεικνύεται η αποτελεσματικότητα της μεταβολής για να μπορεί να θεωρηθεί αποδεκτή η χρήση του τροποποιημένου πρωτοκόλλου. Η αποτελεσματικότητα καταδεικνύεται, μεταξύ άλλων, με επίδειξη της δυνατότητας να ανιχνεύονται οι κύριοι μηχανισμοί θραύσης και προσθήκης ή απώλειας χρωμοσώματος και να επιτυγχάνονται τα ενδεδειγμένα θετικά και αρνητικά αποτελέσματα για την τάξη της μεμονωμένης ουσίας ή του ευρέος φάσματος ουσιών που θα υποβάλλεται στη δοκιμή.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

58. Εάν εφαρμόζεται η τεχνική της αναστολής της κυτταροκίνησης, μόνο οι συχνότητες διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνες (ανεξαρτήτως του αριθμού μικροπυρήνων ανά κύτταρο) χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της επαγωγής μικροπυρήνων. Η καταγραφή του αριθμού κυττάρων με έναν, δύο ή περισσότερους μικροπυρήνες μπορεί να παράσχει χρήσιμες πληροφορίες, αλλά δεν είναι υποχρεωτική.
59. Πρέπει να προσδιορίζονται παράλληλα μέτρα κυτταροτοξικότητας και/ή κυτταρόστασης για όλες τις καλλιέργειες που υποβάλλονται σε αγωγή και τις καλλιέργειες-μάρτυρες φορέα/διαλύτη (58). Όταν εφαρμόζεται η μέθοδος αναστολής της κυτταροκίνησης, πρέπει να υπολογίζεται ο δείκτης CBPI ή RI ως μέτρο της καθυστέρησης του κυτταρικού κύκλου, για όλες τις καλλιέργειες που υποβάλλονται σε αγωγή και τις καλλιέργειες-μάρτυρες. Εάν δεν χρησιμοποιείται cytoB, πρέπει να υπολογίζεται ο δείκτης RPD ή RICC ή PI (βλέπε προσάρτημα 2).
60. Πρέπει να παρέχονται δεδομένα για κάθε καλλιέργεια. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα πρέπει να συγκεφαλαιώνονται με τη μορφή πίνακα.
61. Η επαγωγή μικροπυρήνων από χημικές ουσίες στη δοκιμασία MNvit ενδέχεται να οφείλεται σε θραύση ή απώλεια χρωμοσώματος ή στον συνδυασμό τους. Για να προσδιοριστεί αν ο μηχανισμός επαγωγής μικροπυρήνων συνδέεται με κλαστογόνο ή ανευπλοειδογόνο δράση, είναι δυνατόν να διεξαχθεί περαιτέρω ανάλυση με αντισώματα κινητοχώρου, κεντρομερικούς ανιχνευτές in situ ή με άλλες μεθόδους.

Αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

62. Δεν απαιτείται επαλήθευση των σαφών θετικών ή αρνητικών αποκρίσεων με πρόσθετες δοκιμές. Τα αμφίβολα αποτελέσματα μπορούν να αποσαφηνίζονται με την εξέταση 1 000 επιπλέον κυττάρων, λαμβανόμενων από όλες τις καλλιέργειες, ώστε να τηρείται η τυφλότητα. Εάν το πρόβλημα δεν επιλύεται με την προσέγγιση αυτή, πρέπει να διεξάγονται περαιτέρω δοκιμές. Στα επαναληπτικά πειράματα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο τροποποίησης των παραμέτρων της μελέτης ώστε να καλύπτουν ένα διευρυμένο ή στενότερο πεδίο συνθηκών. Στις παραμέτρους που μπορούν να τροποποιούνται περιλαμβάνονται το εύρος των συγκεντρώσεων δοκιμής, οι χρόνοι αγωγής και συλλογής κυττάρων και/ή οι συνθήκες μεταβολικής ενεργοποίησης.

63. Για να θεωρηθεί ένα αποτέλεσμα θετικό υπάρχουν διάφορα κριτήρια, όπως η σχετιζόμενη με τη συγκέντρωση ή στατιστικά σημαντική αύξηση του αριθμού των κυττάρων που περιέχουν μικροπυρήνες. Πρέπει να εξετάζεται πρώτα η βιολογική συνάφεια των αποτελεσμάτων. Αν εξεταστεί το κατά πόσον οι παρατηρούμενες τιμές περικλείονται στο ιστορικό πεδίο τιμών για τους μάρτυρες, είναι δυνατόν να προκύψουν κατευθύνσεις για την αξιολόγηση της βιολογικής σημαντικότητας της απόκρισης. Μπορούν να χρησιμοποιούνται κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι ως βοήθημα κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών (65). Ωστόσο τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης πρέπει να αντιπαραβάλλονται με τη σχέση δόσης-απόκρισης. Πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπόψη τα δεδομένα αναπαραγωγιμότητας και τα ιστορικά δεδομένα.
64. Αν και από τα περισσότερα πειράματα προκύπτουν σαφώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα, σε ορισμένες περιπτώσεις η σειρά δεδομένων δεν επιτρέπει τη συναγωγή οριστικού συμπεράσματος σχετικά με τη δραστηριότητα της ελεγχόμενης ουσίας. Οι αποκρίσεις μπορεί να παραμένουν αμφίβολες ή αμφισβητήσιμες, ανεξάρτητα από το πόσες φορές θα επαναληφθεί το πείραμα.
65. Τα θετικά αποτελέσματα της δοκιμασίας MNvit υποδηλώνουν ότι η ελεγχόμενη ουσία επάγει θραύση ή απώλεια χρωμοσώματος σε καλλιεργημένα κύτταρα θηλαστικών. Τα αρνητικά αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι, στις συνθήκες της δοκιμής, η ελεγχόμενη ουσία δεν επάγει θραύση και/ή προσθήκη ή απώλεια χρωμοσώματος σε καλλιεργημένα κύτταρα θηλαστικών.

Έκθεση δοκιμής

66. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία, εφόσον αυτά έχουν σημασία για τη διεξαγωγή της μελέτης:

Ελεγχόμενη χημική ουσία

- στοιχεία ταυτότητας και αριθμοί CAS και EC,
- φυσική μορφή και καθαρότητα,
- φυσικοχημικές ιδιότητες που έχουν σημασία για τη διεξαγωγή της μελέτης,
- ικανότητα αντίδρασης της ελεγχόμενης ουσίας με τον διαλύτη/φορέα ή τα θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιέργειας.

Διαλύτης/φορέας

- αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα,
- διαλυτότητα και σταθερότητα της ελεγχόμενης ουσίας στον διαλύτη/φορέα.

Κύτταρα

- τύπος και προέλευση των χρησιμοποιούμενων κυττάρων,
- καταλληλότητα του χρησιμοποιούμενου τύπου κυττάρων,
- απουσία μυκοπλάσματος, εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- στοιχεία σχετικά με τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, τον χρόνο διπλασιασμού ή τον δείκτη πολλαπλασιασμού,
- σε περίπτωση χρήσης λεμφοκυττάρων, φύλο, ηλικία και αριθμός των δοτών αίματος, εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- σε περίπτωση χρήσης λεμφοκυττάρων, προσδιορίζεται αν εκτέθηκαν στην ουσία ολικό αίμα ή διαχωρισμένα λεμφοκύτταρα,
- αριθμός ανακαλλιεργιών, εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- μέθοδοι συντήρησης των κυτταροκαλλιεργιών, εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- τυπικός αριθμός χρωμοσωμάτων,
- κανονική διάρκεια (αρνητικός μάρτυρας) του κυτταρικού κύκλου.

Συνθήκες δοκιμής

- ταυτότητα του αναστολέα κυτταροκίνησης (π.χ. cytoB), εάν χρησιμοποιείται, συγκέντρωση της ουσίας αυτής και διάρκεια έκθεσης των κυττάρων,
- αιτιολόγηση της επιλογής των συγκεντρώσεων και του αριθμού καλλιεργιών, συμπεριλαμβανομένων δεδομένων για την κυτταροτοξικότητα και των περιορισμών από πλευράς διαλυτότητας, εάν υπάρχουν,

- σύνθεση των θρεπτικών υλικών και συγκέντρωση CO₂, εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας,
- συγκέντρωση (και/ή όγκος) του φορέα και της ελεγχόμενης ουσίας που προστίθεται,
- θερμοκρασία και χρόνος επώασης,
- διάρκεια της αγωγής,
- χρόνος συλλογής μετά την αγωγή,
- πυκνότητα των κυττάρων στην ανακαλλιέργεια, εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- τύπος και σύσταση του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης, συμπεριλαμβανομένων κριτηρίων αποδοχής,
- θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες,
- χρησιμοποιούμενες μέθοδοι ετοιμασίας και τεχνική χρώσης αντικειμενοφόρων πλακών,
- κριτήρια αναγνώρισης μικροπυρήνων,
- αριθμοί εξετασθέντων κυττάρων,
- μέθοδοι μέτρησης της κυτταροτοξικότητας,
- τυχόν συμπληρωματικές πληροφορίες που αφορούν την κυτταροτοξικότητα,
- κριτήρια χαρακτηρισμού των μελετών ως θετικών, αρνητικών ή αμφίβολων,
- χρησιμοποιούμενες μέθοδοι στατιστικής ανάλυσης,
- μέθοδοι, π.χ. χρήση αντισωμάτων κινητοχώρου, που χρησιμοποιούνται για να διαπιστωθεί αν οι μικροπυρήνες περιέχουν ολόκληρα χρωμοσώματα ή τμήματα χρωμοσωμάτων, εφόσον συντρέχει περίπτωση.

Αποτελέσματα

- χρησιμοποιούμενο μέτρο κυτταροτοξικότητας, π.χ. δείκτης CBPI ή RI, στην περίπτωση της μεθόδου αναστολής κυτταροκίνησης, δείκτης RICC, RPD ή PI, όταν δεν χρησιμοποιούνται μέθοδοι αναστολής κυτταροκίνησης· άλλες παρατηρήσεις, εφόσον συντρέχει περίπτωση, π.χ. συρρέουσα καλλιέργεια, απόπτωση, νέκρωση, καταμέτρηση μετάφασης, συχνότητα διπύρηνων κυττάρων,
- σημεία καθίζησης,
- δεδομένα για το pH και την οσμωτικότητα του θρεπτικού υλικού αγωγής, εφόσον προσδιορίστηκαν,
- ορισμός των αποδεκτών για εξέταση κυττάρων,
- κατανομή των μονοπύρηνων, διπύρηνων και πολυπύρηνων κυττάρων, εάν χρησιμοποιείται μέθοδος αναστολής κυτταροκίνησης,
- αριθμός κυττάρων με μικροπυρήνες ανά καλλιέργεια που υποβλήθηκε σε αγωγή και ανά καλλιέργεια-μάρτυρα, με τη διευκρίνιση αν πρόκειται για διπύρηνια ή μονοπύρηνια κύτταρα, εφόσον ενδείκνυται,
- σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατόν,
- δεδομένα για τους παράλληλους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) και θετικούς μάρτυρες (συγκεντρώσεις και διαλύτες),
- ιστορικά δεδομένα για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) και θετικούς μάρτυρες, με πεδία τιμών, μέσες τιμές, τυπικές αποκλίσεις και διάστημα εμπιστοσύνης (π.χ. 95 %),
- στατιστική ανάλυση, τιμές p, εάν υπάρχουν.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

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

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

- (51) Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M. and Parry, J.M. (1996), An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, *Mutagenesis*, 11, 247-274.
- (52) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, *In: Tice, R.R., Costa, D.L. and Schaich, K.M. (eds), Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, pp. 91-103.
- (53) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983), Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay, *Environ. Mutagenesis* 5, 795-801.
- (54) Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Res.*, 285, 35-44.
- (55) Phelps, J.B., Garriott, M.L., and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 521, 103-112.
- (56) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A. (2004), Corrigendum to "Report from the *in vitro* micronucleus assay working group", *Mutation Res.*, 564, 97-100.
- (57) Pincu, M., Bass, D. and Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.*, 139, 61-65.
- (58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. and Kirkland, D. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Res.*, 655, 1-3.
- (59) Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. and Marcos, R. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 341, 169-184.
- (60) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environ. Molec. Mutagenesis* 35, 191-201.
- (61) Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.
- (62) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, 269-275.
- (63) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.
- (64) Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 534, 65-75.
- (65) Hoffman, W.P., Garriott, M.L. and Lee, C. (2003), *In vitro* micronucleus test, *In: Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp. 463-467.
- (66) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 850/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 29ης Απριλίου 2004, για τους έμμοτους οργανικούς ρύπους και την τροποποίηση της οδηγίας 79/117/ΕΟΚ (ΕΕ L 229 της 30.4.2004, σ. 5).

Προσάρτημα 1

Ορισμοί

Ανευπλοειδογόνος παράγοντας: κάθε ουσία ή διεργασία που προκαλεί ανευπλοειδία σε κύτταρα ή οργανισμούς, μέσω της αντίδρασης της με τα συστατικά του κυτταρικού κύκλου μιτωτικής και μειωτικής διαίρεσης.

Ανευπλοειδία: κάθε απόκλιση από τον φυσιολογικό διπλοειδή (ή απλοειδή) χρωμοσωματικό αριθμό που εμφανίζεται σε ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα, όχι όμως σε πλήρεις σειρές χρωμοσωμάτων (πολυπλοειδία).

Απόπτωση: προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, ο οποίος χαρακτηρίζεται από μια σειρά σταδίων που οδηγούν στη διάσπαση των κυττάρων προς συνδεδεμένα με την κυτταρική μεμβράνη σωματίδια τα οποία, στη συνέχεια, απομακρύνονται με φαγοκυττάρωση ή αποβολή.

Κυτταρικός πολλαπλασιασμός: αύξηση του αριθμού των κυττάρων η οποία είναι αποτέλεσμα της μιτωτικής τους διαίρεσης.

Κεντρομερίδιο (ή κεντρομερές): περιοχή DNA του χρωμοσώματος στην οποία συγκρατούνται μεταξύ τους οι δύο χρωματίδες και είναι προσδεδεμένοι εκτέρωθεν οι δύο κινητοχώροι.

Κλαστογόνος παράγοντας: κάθε ουσία ή διεργασία που προκαλεί δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες σε πληθυσμούς κυττάρων ή οργανισμούς.

Κυτταροκίνηση: η διαδικασία κυτταρικής διαίρεσης αμέσως μετά τη μίτωση για τον σχηματισμό δύο θυγατρικών κυττάρων, το καθένα από τα οποία περιέχει έναν μόνο πυρήνα.

Δείκτης πολλαπλασιασμού με αναστολή κυτταροκίνησης (CBPI): το ποσοστό κυττάρων από δεύτερη διαίρεση στον υποβαλλόμενο σε αγωγή πληθυσμό σε σχέση με τον μάρτυρα που δεν υποβάλλεται σε αγωγή (βλέπε μαθηματικό τύπο στο προσάρτημα 2).

Κυτταρόσταση: αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων (βλέπε μαθηματικό τύπο στο προσάρτημα 2)

Κυτταροτοξικότητα: επιβλαβείς επιδράσεις στη δομή ή τη λειτουργία του κυττάρου, με τελικό αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο.

Γονιδιοτοξική δράση: γενικός όρος που καλύπτει όλα τα είδη βλαβών του DNA ή του χρωμοσώματος, στις οποίες συγκαταλέγονται η θραύση, η προσθήκη, η αναδιάταξη, η μετάλλαξη, οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες και η ανευπλοειδία. Δεν προκαλούν όλες οι γονιδιοτοξικές επιδράσεις μεταλλάξεις ή σταθερές βλάβες του χρωμοσώματος.

Μεσοφασικά κύτταρα: κύτταρα που δεν βρίσκονται στο μιτωτικό στάδιο.

Κινητοχώρος: πρωτεϊνική δομή που συναρμολογείται στο κεντρομερίδιο του χρωμοσώματος και με την οποία ενώνονται οι μικροσωληνίσκοι της ατράκτου κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, κατευθύνοντας την τακτική κίνηση των θυγατρικών χρωμοσωμάτων προς τους πόλους των θυγατρικών κυττάρων.

Μικροπυρήνες: μικροί πυρήνες, διακριτοί από τους κύριους πυρήνες των κυττάρων και επιπρόσθετοι, οι οποίοι παράγονται κατά τη διάρκεια της τελόφασης της μίτωσης (μείωση) από καθυστερούντα τμήματα χρωμοσώματος ή ολόκληρα χρωμοσώματα.

Μίτωση: διαίρεση του κυτταρικού πυρήνα, η οποία συνήθως χωρίζεται σε πρόφαση, προμετάφαση, μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση.

Μιτωτικός δείκτης: ο λόγος των κυττάρων που βρίσκονται σε μετάφαση διά του συνολικού αριθμού των κυττάρων που παρατηρούνται σε έναν κυτταρικό πληθυσμό· αποτελεί ένδειξη του βαθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού του συγκεκριμένου πληθυσμού.

Μεταλλαξιόγνος παράγοντας: παράγοντας που προκαλεί κληρονομήσιμη μεταβολή είτε μιας ή περισσότερων ακολουθιών ζευγών βάσεων του DNA στα γονίδια είτε της δομής των χρωμοσωμάτων (χρωμοσωματικές ανωμαλίες).

Μη αποχωρισμός: αδυναμία των ζευγών χρωματίδων να αποχωριστούν και να διαχωριστούν σωστά στα αναπτυσσόμενα θυγατρικά κύτταρα, με αποτέλεσμα τα θυγατρικά κύτταρα να μην έχουν κανονικό αριθμό χρωμοσωμάτων.

Πολυπλοειδία: αριθμητικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες κυττάρων ή οργανισμών, οι οποίες αφορούν πλήρεις σειρές χρωμοσωμάτων, σε αντίθεση με εκείνες που αφορούν ένα ή περισσότερα μεμονωμένα χρωμοσώματα (ανευπλοειδία).

Δείκτης πολλαπλασιασμού (PI): μέθοδος μέτρησης της κυτταροτοξικότητας, όταν δεν χρησιμοποιείται κυτταροχλασίνη B (βλέπε μαθηματικό τύπο στο προσάρτημα 2).

Σχετική αύξηση του καταμετρούμενου αριθμού κυττάρων (RICC): μέθοδος μέτρησης της κυτταροτοξικότητας, όταν δεν χρησιμοποιείται κυτταροχλασίνη B (βλέπε μαθηματικό τύπο στο προσάρτημα 2).

Σχετικός διπλασιασμός του πληθυσμού (RPD): μέθοδος μέτρησης της κυτταροτοξικότητας, όταν δεν χρησιμοποιείται κυτταροχλασίνη B (βλέπε μαθηματικό τύπο στο προσάρτημα 2).

Δείκτης αναδιπλασιασμού (RI): το ποσοστό κυτταρικών κύκλων διαίρεσης που ολοκληρώνονται σε υποβαλλόμενη σε αγωγή καλλιέργεια, σε σχέση με τον μάρτυρα που δεν υποβάλλεται σε αγωγή, κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης και της αποκατάστασης (βλέπε μαθηματικό τύπο στο προσάρτημα 2).

Ελεγχόμενη χημική ουσία (καλούμενη επίσης "ελεγχόμενη ουσία"): κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Προσάρτημα 2

Μαθηματικοί τύποι για την εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας

1. Όταν χρησιμοποιείται *cytoB*, η κυτταροτοξικότητα πρέπει να εκτιμάται με βάση τον δείκτη πολλαπλασιασμού με αναστολή κυτταροκίνησης (CBPI) ή τον δείκτη αναδιπλασιασμού (RI) (16) (58). Ο CBPI δείχνει τον μέσο αριθμό κυτταρικών κύκλων ανά κύτταρο κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης στην *cytoB* και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ο RI δείχνει τον σχετικό αριθμό πυρήνων στις υποβαλλόμενες σε αγωγή καλλιέργειες σε σχέση με τις καλλιέργειες-μάρτυρες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του επί τοις εκατό ποσοστού κυτταρόστασης.

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

και

T = καλλιέργεια που υποβάλλεται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία

C = καλλιέργεια-μάρτυρας με φορέα

όπου:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{αριθ. μονοπύρηνων κυττάρων}) + (2 \times \text{αριθ. διπύρηνων κυττάρων}) + (3 \times \text{αριθ. πολυπύρηνων κυττάρων}))}{(\text{συνολικός αριθ. κυττάρων})}$$

Συνεπώς, μια τιμή CBPI ίση με 1 (όλα τα κύτταρα είναι μονοπύρηνια) ισοδυναμεί με κυτταρόσταση 100 %.

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

$$\text{RI} = \frac{((\text{αριθ. διπύρηνων κυττάρων}) + (2 \times \text{αριθ. πολυπύρηνων κυττάρων})) \div (\text{συνολικός αριθ. κυττάρων})_T}{((\text{αριθ. διπύρηνων κυττάρων}) + (2 \times \text{αριθ. πολυπύρηνων κυττάρων})) \div (\text{συνολικός αριθ. κυττάρων})_C} \times 100$$

T = υποβαλλόμενες σε αγωγή καλλιέργειες

C = καλλιέργειες-μάρτυρες

2. Συνεπώς, μια τιμή RI ίση με 53 % σημαίνει ότι στην υποβληθείσα σε αγωγή καλλιέργεια διαιρέθηκε μόνο το 53 % του αριθμού των κυττάρων που διαιρέθηκαν στην καλλιέργεια-μάρτυρα προς σχηματισμό διπύρηνων και πολυπύρηνων κυττάρων, δηλαδή κυτταρόσταση 47 %.

3. Όταν δεν χρησιμοποιείται *cytoB*, συνιστάται η εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας με βάση τη σχετική αύξηση του καταμετρούμενου αριθμού κυττάρων (RICC) ή τον σχετικό διπλασιασμό του πληθυσμού (RPD) (58), δεδομένου ότι και στις δύο αυτές παραμέτρους λαμβάνεται υπόψη το διαιρεθέν ποσοστό του κυτταρικού πληθυσμού.

$$\text{RICC} = \frac{(\text{αύξηση του αριθμού κυττάρων στις καλλιέργειες αγωγής (τελικός - αρχικός)})}{(\text{αύξηση του αριθμού κυττάρων στις καλλιέργειες - μάρτυρες (τελικός - αρχικός)})} \times 100$$

$$\text{RPD} = \frac{(\text{αριθ. διπλασιασμών του πληθυσμού στις καλλιέργειες αγωγής})}{(\text{αριθ. διπλασιασμών του πληθυσμού στις καλλιέργειες - μάρτυρες})} \times 100$$

όπου:

$$\text{Διπλασιασμός πληθυσμού} = [\log (\text{αριθ. κυττάρων μετά την αγωγή} \div \text{αρχικός αριθ. κυττάρων})] \div \log 2$$

4. Συνεπώς μια τιμή RICC ή RPD ίση με 53 % δείχνει κυτταροτοξικότητα/κυτταρόσταση 47 %.

5. Η κυτταροτοξικότητα είναι δυνατόν να εκτιμηθεί μέσω της καταμέτρησης των κλώνων που αποτελούνται από 1 (c1), 2 (c2), 3 έως 4 (c4) και 5 έως 8 (c8) κύτταρα, με τη βοήθεια δείκτη πολλαπλασιασμού (PI).

$$\text{PI} = \frac{((1 \times \text{c1}) + (2 \times \text{c2}) + (3 \times \text{c4}) + (4 \times \text{c8}))}{(\text{c1} + \text{c2} + \text{c4} + \text{c8})}$$

6. Ο PI έχει χρησιμοποιηθεί ως χρήσιμη και αξιόπιστη παράμετρος κυτταροτοξικότητας και στην περίπτωση των κυτταρικών σειρών που καλλιεργούνται *in situ* χωρίς *cytoB* (25) (26) (27) (28).

Προσάρτημα 3

Συνιστώμενες χημικές ουσίες αναφοράς για την αξιολόγηση των επιδόσεων (1)

Κατηγορία	Χημική ουσία	Αριθ. CAS	Αριθ. EC
1. Κλαστογόνες ουσίες που δρουν χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση			
	Αραβινοζιτής κυτοσίνης	147-94-4	205-705-9
	Μιτομυκίνη C	50-07-7	200-008-6
2. Κλαστογόνες ουσίες που απαιτούν μεταβολική ενεργοποίηση			
	Βενζο[α]πυρένιο	50-32-8	200-028-5
	Κυκλοφωσφamide	50-18-0	200-015-4
3. Ανευπλοειδογόνες ουσίες			
	Κολχικίνη	64-86-8	200-598-5
	Βινβλαστίνη	143-67-9	205-606-0
4. Ουσίες αρνητικού αποτελέσματος			
	Φθαλικό δι(2-αιθυλεξύλιο)	117-81-7	204-211-0
	Ναλιδιξικό οξύ	389-08-2	206-864-7
	Πυρένιο	129-00-0	204-927-3
	Χλωριούχο νάτριο	7647-14-5	231-598-3

(1) Χημικές ουσίες αναφοράς είναι εκείνες που συνιστάται να χρησιμοποιούνται. Είναι δυνατή η υποκατάσταση ή προσθήκη ουσιών στον κατάλογο χημικών ουσιών αναφοράς εάν η δραστηριότητά τους είναι γνωστή, εάν επάγουν μικροπυρήνες με τους ίδιους μηχανισμούς δράσης και εάν είναι αποδεδειγμένα συναφείς με τις χημικές ουσίες που θα υποβάλλονται σε δοκιμή με τη διαδικασία MNvit. Ανάλογα με τον επιδιωκόμενο σκοπό, η σχετική αιτιολόγηση μπορεί να περιλαμβάνει και μελέτη επικύρωσης στην οποία χρησιμοποιήθηκε ευρύ φάσμα ουσιών ή η οποία επικεντρώθηκε σε στενότερο φάσμα, με βάση τη χημική τάξη της ελεγχόμενης ουσίας ή τον μελετώμενο μηχανισμό πρόκλησης βλάβης.

B.50. ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΡΜΑΤΟΣ: ΤΟΠΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΛΕΜΦΑΔΕΝΩΝ: DA

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- Οι κατευθυντήριες γραμμές του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών με χημικές ουσίες και οι μέθοδοι δοκιμών της ΕΕ επανεξετάζονται κατά περιόδους με βάση την επιστημονική πρόοδο, τις μεταβαλλόμενες ανάγκες κανονιστικής ρύθμισης και τον προβληματισμό όσον αφορά την καλή μεταχείριση των ζώων. Η πρώτη μέθοδος δοκιμών (B.42) για τον προσδιορισμό της ευαισθητοποίησης του δέρματος σε ποντικούς, δηλαδή η τοπική δοκιμασία λεμφαδένων (LLNA – κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 429) αναθεωρήθηκε (1). Έχουν δημοσιευθεί λεπτομερείς περιγραφές της επικύρωσης της LLNA, καθώς και επισκόπηση των σχετικών εργασιών (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Στην LLNA χρησιμοποιείται ραδιενεργός θυμιδίνη ή ραδιενεργό ιώδιο για τη μέτρηση του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η χρήση της δοκιμασίας όταν υπάρχουν προβλήματα προμήθειας, χρήσης ή τελικής διάθεσης ραδιοϊσοτόπων. Η μέθοδος δοκιμών LLNA: DA (αναπτύχθηκε από την εταιρεία Daicel Chemical Industries, Ltd.) αποτελεί τροποποίηση της LLNA που δεν απαιτεί ραδιενέργεια και στην οποία προσδιορίζεται, μέσω της βιοφωταύγειας, η περιεκτικότητα σε τριφωσφορική αδενοσίνη (αδενοσινوترιφωσφορικό οξύ, ATP) ως δείκτης πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων. Η LLNA: DA επικυρώθηκε, επανεξετάστηκε και συνιστάται από διεθνή επιτροπή αξιολόγησης από ομότιμους κριτές, καθώς θεωρείται χρήσιμη για την αναγνώριση των ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών για το δέρμα χημικών ουσιών, με ορισμένους περιορισμούς (10) (11) (12) (13). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών σχεδιάστηκε για την εκτίμηση του δερματικού ευαισθητοποιητικού δυναμικού των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) στα ζώα. Το κεφάλαιο B.6 του παρόντος παραρτήματος και η κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 406 συνιστάται σε δοκιμές σε ινδικά χοιρίδια, συγκεκριμένα στη δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικά χοιρίδια και τη δοκιμή Buehler (14). Τόσο η LLNA (κεφάλαιο B.42 του παρόντος παραρτήματος, OECD Test Guideline 429), όσο και οι δύο τροποποιήσεις της που δεν απαιτούν ραδιενέργεια – LLNA: DA (κεφάλαιο B.50 του παρόντος παραρτήματος, OECD Test Guideline 442 A) και LLNA: BrdU-ELISA (κεφάλαιο B.51 του παρόντος παραρτήματος, OECD Test Guideline 442 B) – προσφέρουν πλεονέκτημα έναντι των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια που περιγράφονται στο κεφάλαιο B.6 και στην κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 406 (14), όσον αφορά τον περιορισμό και τη βελτίωση της χρήσης ζώων.
- Η LLNA: DA, όπως και η LLNA, μελετά την επαγωγική φάση της δερματικής ευαισθητοποίησης και παρέχει κατάλληλα ποσοτικά δεδομένα για την εκτίμηση της σχέσης δόσης-απόκρισης. Επιπλέον, η ικανότητα ανίχνευσης των ευαισθητοποιητικών για το δέρμα ουσιών χωρίς να χρειάζεται ραδιοσημάνση για το DNA αποκλείει το ενδεχόμενο επαγγελματικής έκθεσης σε ραδιενέργεια και αίρει τα προβλήματα διάθεσης των αποβλήτων. Αυτό παρέχει τη δυνατότητα αύξησης της χρήσης ποντικών για την ανίχνευση των ευαισθητοποιητικών για το δέρμα ουσιών, χάρη στην οποία θα μπορούσε να περιορισθεί περαιτέρω η χρήση ινδικών χοιριδίων σε δοκιμές για τη διαπίστωση του δυναμικού δερματικής ευαισθητοποίησης (κεφάλαιο B.6, OECD Test Guideline 406) (14).

ΟΡΙΣΜΟΙ

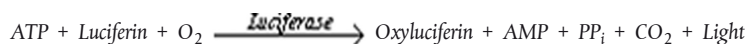
- Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

4. Η δοκιμασία LLNA: DA αποτελεί τροποποιημένη μέθοδο LLNA για την αναγνώριση χημικών ουσιών που πιθανώς προκαλούν δερματική ευαισθητοποίηση, με συγκεκριμένους περιορισμούς. Αυτό δεν σημαίνει κατ' ανάγκη ότι η LLNA: DA πρέπει να χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση αντί της LLNA ή των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια (κεφάλαιο B.6, OECD Test Guideline 406) (14), αλλά μάλλον ότι είναι εφάμιλλη των τελευταίων και μπορεί να χρησιμοποιείται ως εναλλακτική λύση, η οποία κατά κανόνα δεν απαιτεί περαιτέρω επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, θετικών και αρνητικών (10) (11). Πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης, το εργαστήριο δοκιμών πρέπει να λαμβάνει υπόψη όλα τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, μεταξύ των οποίων την ταυτότητα και τη χημική δομή της, τις φυσικές και χημικές ιδιότητές της, τα αποτελέσματα τυχόν άλλων δοκιμών τοξικότητας της ουσίας, in vitro ή in vivo, και τα τοξικολογικά δεδομένα του αφορούν χημικά προϊόντα ανάλογης δομής. Τα στοιχεία αυτά θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη προκειμένου να κριθεί αν η LLNA: DA είναι κατάλληλη για την ελεγχόμενη ουσία (με δεδομένη την ασυμβατότητα περιορισμένου αριθμού ειδών χημικών προϊόντων με την LLNA: DA —βλέπε παράγραφο 5) και ως βοήθημα κατά την επιλογή δόσεων.
5. Η LLNA: DA είναι μέθοδος in vivo και, επομένως, δεν καταργεί τη χρήση ζώων στην εκτίμηση της δραστηριότητας αλλεργικής ευαισθητοποίησης εξ επαφής. Είναι ωστόσο ικανή να περιορίσει τη χρήση ζώων για τον σκοπό αυτό, σε σύγκριση με τις δοκιμές σε ινδικά χοιρίδια (κεφάλαιο B.6, OECD Test Guideline 406) (14). Επιπλέον, η LLNA: DA βελτιώνει ουσιαστικά (ελάττωση του πόνου και της δυσφορίας) τον τρόπο με τον οποίο χρησιμοποιούνται τα ζώα στις δοκιμές αλλεργικής ευαισθητοποίησης εξ επαφής, δεδομένου ότι, σε αντίθεση με τη μέθοδο δοκιμών B.6 και την κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 406, δεν απαιτεί την εκδήλωση των επαγόμενων από το ερέθισμα αντιδράσεων δερματικής υπερευαισθησίας. Παρά τα πλεονεκτήματα της LLNA: BrdU-DA έναντι των μεθόδων B.6 και OECD Test Guideline 406 (14), υπάρχουν ορισμένοι περιοριστικοί παράγοντες που ενδέχεται να επιβάλλουν τη χρήση των B.6 και OECD Test Guideline 406 (π.χ. δοκιμές με ορισμένα μέταλλα, ψευδοθετικά ευρήματα που ορισμένες ερεθιστικές για το δέρμα ουσίες [όπως ορισμένα επιφανειοδραστικά χημικά προϊόντα] (6) (1 και κεφάλαιο B.42 του παρόντος παραρτήματος), η διαλυτότητα της ελεγχόμενης ουσίας). Επιπροσθέτως, η χρήση των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια [μέθοδοι B.6, OECD Test Guideline 406 (14)] ενδέχεται να καταστεί αναγκαία στην περίπτωση χημικών ουσιών ή τάξεων χημικών ουσιών που περιέχουν δραστικές ομάδες οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να αποτελέσουν συγχυτικούς παράγοντες (16). Οι περιορισμοί που έχουν προσδιοριστεί για την LLNA (1 και κεφάλαιο B.42 του παρόντος παραρτήματος) συνιστάται να ισχύουν και για την LLNA: BrdU-DA (10). Επιπλέον, η χρήση της LLNA: DA πιθανώς να μην ενδείκνυται για τις δοκιμές με ουσίες που επηρεάζουν τα επίπεδα ATP (π.χ. ουσίες που δρουν ως αναστολείς της ATP) ή την ακριβή μέτρηση της ενδοκυττάριας ATP (π.χ. παρουσία ενζύμων που διασπούν την ATP, παρουσία εξωκυττάριας ATP στον λεμφαδένα). Εκτός αυτών των εντοπισθέντων περιορισμών, θεωρείται ότι η LLNA: DA μπορεί να εφαρμοστεί στις δοκιμές οποιασδήποτε ουσίας, εκτός εάν αυτή έχει ιδιότητες που ενδέχεται να επηρεάσουν την ορθότητα της μεθόδου. Επιπροσθέτως, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πιθανότητα οριακών θετικών αποτελεσμάτων όταν οι τιμές του δείκτη διέγερσης (SI) κυμαίνονται από 1,8 έως 2,5 (βλέπε παραγράφους 31-32). Αυτό στηρίζεται στη βάση δεδομένων επικύρωσης για 44 ουσίες με τη χρήση SI $\geq 1,8$ (βλέπε παράγραφο 6), από τις οποίες αναγνωρίστηκαν σωστά με την LLNA: DA και οι 32 ευαισθητοποιητικές βάσει της LLNA, αλλά δεν αναγνωρίστηκαν σωστά 3 από τις 12 μη ευαισθητοποιητικές βάσει της LLNA ουσίες με τιμές SI μεταξύ 1,8 και 2,5 (δηλαδή οριακό θετικό αποτέλεσμα) (10). Επειδή, ωστόσο, χρησιμοποιήθηκε η ίδια σειρά δεδομένων για τον καθορισμό των τιμών του SI και για τον υπολογισμό των προγνωστικών ιδιοτήτων της δοκιμής, τα αναφερόμενα αποτελέσματα μπορεί να συνιστούν υπερεκτίμηση των πραγματικών προγνωστικών ιδιοτήτων.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

6. Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η LLNA: DA είναι ότι οι ευαισθητοποιητικές ουσίες επάγουν πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων των λεμφαδένων που αποχετεύουν το σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας. Ο πολλαπλασιασμός αυτός είναι ανάλογος με τη δόση και με την ισχύ του σε εφαρμοζόμενου αλλεργιογόνου και αποτελεί ένα απλό μέσο αντικειμενικής, ποσοτικής μέτρησης της ευαισθητοποίησης. Μετράται με σύγκριση του αριθμητικού μέσου του πολλαπλασιασμού σε κάθε ομάδα δοκιμής προς τον αριθμητικό μέσο του πολλαπλασιασμού στην ομάδα-μάρτυρα που έχει υποβληθεί σε αγωγή με τον φορέα (VC). Προσδιορίζεται ο λόγος του αριθμητικού μέσου του πολλαπλασιασμού σε κάθε ομάδα που υποβάλλεται σε αγωγή προς την αντίστοιχη τιμή για την παράλληλη ομάδα VC, ο οποίος καλείται δείκτης διέγερσης (SI) και πρέπει να είναι $\geq 1,8$ ώστε να δικαιολογείται η περαιτέρω αξιολόγηση μιας ελεγχόμενης ουσίας ως δυνητικά ευαισθητοποιητικής για το δέρμα. Οι διαδικασίες που περιγράφονται στο παρόν κεφάλαιο βασίζονται στη μέτρηση της περιεκτικότητας σε ATP μέσω της βιοφωταύγειας (που είναι γνωστό ότι συσχετίζεται με τον αριθμό ζωντανών κυττάρων) (17) ως ένδειξης αυξημένου αριθμού πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων στους αποχετευτικούς οπτικούς λεμφαδένες (18) (19). Στη μέθοδο βιοφωταύγειας χρησιμοποιείται το ένζυμο λουσιφεράση για να καταλύσει την εκπομπή φωτός κατά την ακόλουθη αντίδραση ATP με λουσιφερίνη:



Η ένταση του εκπνεόμενου φωτός συνδέεται με γραμμική σχέση με τη συγκέντρωση ATP και μετράται με ειδικό φωτόμετρο φωταυγιομετρίας (λουμινόμετρο). Η δοκιμασία λουσιφερίνης-λουσιφεράσης αποτελεί ευαίσθητη μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού της ATP με ευρύ φάσμα εφαρμογών (20).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Επιλογή ζωικού είδους

7. Το είδος που έχει επιλεγεί για τη συγκεκριμένη δοκιμή είναι ο ποντικός. Οι μελέτες επικύρωσης της LLNA: DA διεξήχθησαν αποκλειστικά σε ποντικούς της φυλής CBA/J, η οποία κατά συνέπεια θεωρείται προτιμώμενη (12) (13). Χρησιμοποιούνται νεαροί ενήλικες θηλυκοί ποντικοί που δεν έχουν ποτέ γεννήσει ούτε εγκυμονούν. Κατά την έναρξη της μελέτης, η ηλικία των ζώων πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 8 και 12 εβδομάδων και οι διαφορές βάρους μεταξύ τους πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το 20 % της μέσης τιμής. Εναλλακτικά, είναι δυνατή η χρήση άλλων φυλών, καθώς και αρσενικών ζώων, εφόσον έχουν συγκεντρωθεί επαρκή δεδομένα από τα οποία προκύπτει ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές απόκρισης κατά την LLNA: DA, οφειλόμενες ειδικά στη φυλή και/ή το φύλο.

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

8. Οι ποντικοί πρέπει να στεγάζονται σε ομάδες (21), εκτός εάν η ατομική στέγασή τους δικαιολογείται με επαρκή επιστημονική αιτιολόγηση. Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζων πρέπει να είναι 22 ± 3 °C. Αν και η σχετική υγρασία πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εντούτοις ο στόχος θα πρέπει να είναι μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12ώρου. Για τη διατροφή επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού.

Προετοιμασία των ζώων

9. Τα ζώα επιλέγονται τυχαία, σημαίνονται με τρόπο που επιτρέπει την αναγνώριση του καθενός (αλλά όχι με αναγνωριστικό ενώτιο οποιασδήποτε μορφής) και παραμένουν στους κλωβούς τους τουλάχιστον για πέντε ημέρες πριν από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων, ώστε να εγκλιματιστούν στις εργαστηριακές συνθήκες. Πριν από την έναρξη της αγωγής, εξετάζονται όλα τα ζώα για να είναι βέβαιο ότι δεν παρουσιάζουν εμφανείς βλάβες του δέρματος.

Παρασκευή των διαλυμάτων δοσολογίας

10. Πριν από την εφαρμογή στο αυτί ποντικού, τα στερεά χημικά προϊόντα πρέπει να διαλύονται, ή να σχηματίζεται εναιώρημά τους, σε κατάλληλους διαλύτες/φορείς και να αραιώνονται, εφόσον ενδείκνυται. Τα υγρά χημικά προϊόντα μπορούν να εφαρμόζονται ως έχουν ή να αραιώνονται πριν από τη χορήγηση. Τα αδιάλυτα χημικά προϊόντα, όπως αυτά που συναντώνται συνήθως στα ιατροτεχνολογικά είδη, πρέπει να υποβάλλονται σε εξαντλητική εκχύλιση με κατάλληλο διαλύτη, ώστε να παραλαμβάνονται όλα τα εκχυλίσματα συστατικά για δοκιμή, πριν από την εφαρμογή στο αυτί ποντικού. Τα παρασκευάσματα της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να ανανεώνονται καθημερινά, εκτός εάν η φύλαξή τους είναι αποδεκτή βάσει των σχετικών με τη σταθερότητα στοιχείων.

Έλεγχος αξιοπιστίας

11. Χρησιμοποιούνται χημικά προϊόντα ως θετικοί μάρτυρες για να καταδειχθεί η ορθή εκτέλεση της δοκιμασίας με την απόκριση, με επαρκή και αναπαραγώγιμη ευαισθησία, σε ευαισθητοποιητική ελεγχόμενη ουσία για την οποία έχει χαρακτηριστεί επακριβώς το μέγεθος της απόκρισης. Συνιστάται η συμπερίληψη παράλληλου θετικού μάρτυρα επειδή καταδεικνύει την ικανότητα του εργαστηρίου να εκτελεί με επιτυχία κάθε δοκιμασία και καθιστά δυνατή την εκτίμηση της ενδοεργαστηριακής και διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και συγκρισιμότητας. Επίσης, καθώς ορισμένες ρυθμιστικές Αρχές απαιτούν τη χρήση θετικού μάρτυρα σε κάθε μελέτη, συνιστάται στους χρήστες να ζητούν τη γνώμη των αρμόδιων αρχών πριν από τη διεξαγωγή της LLNA: DA. Συνιστάται, επομένως, η χρήση παράλληλου θετικού μάρτυρα ως συνήθης πρακτική, ώστε να μην χρειάζονται πρόσθετες δοκιμές σε ζώα για την κάλυψη των αναγκών που μπορεί να δημιουργήσει η περιοδική χρήση θετικών μαρτύρων (βλέπε παράγραφο 12). Ένας θετικός μάρτυρας θα πρέπει να δίδει θετική απόκριση κατά την LLNA: DA σε επίπεδα έκθεσης τα οποία αναμένεται να προκαλέσουν αύξηση του SI σε τιμή $\geq 1,8$ σε σύγκριση με την ομάδα αρνητικού μάρτυρα. Η δόση για τον θετικό μάρτυρα πρέπει να επιλέγεται κατά τρόπο ώστε να μην προκαλεί υπέρμετρο ερεθισμό του δέρματος ή συστηματική τοξικότητα και η επαγωγή να είναι αναπαραγώγιμη αλλά όχι υπερβολική (δηλαδή οι τιμές SI > 10 θεωρούνται υπέρμετρες). Οι προτιμώμενοι θετικοί μάρτυρες είναι το διάλυμα εξυλοκινναμωμικής αλδεύδης (αριθ. Chemical Abstracts Service [CAS] 101-86-0) 25 % και το διάλυμα ευγενόλης (αριθ. CAS 97-53-0) 25 % σε μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου (4:1, v/v). Σε ορισμένες, δεόντως αιτιολογημένες, περιπτώσεις μπορούν να χρησιμοποιούνται άλλοι θετικοί μάρτυρες που πληρούν τα προαναφερόμενα κριτήρια.
12. Παρά τη σύσταση για συμπερίληψη παράλληλης ομάδας θετικού μάρτυρα, σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να αρκεί η περιοδική δοκιμή του θετικού μάρτυρα (δηλαδή ανά διαστήματα που δεν υπερβαίνουν το εξάμηνο) για εργαστήρια που εκτελούν τακτικά LLNA: DA (δηλαδή με συχνότητα τουλάχιστον μηνιαία) και διαθέτουν εδραιωμένη ιστορική βάση δεδομένων για τον θετικό μάρτυρα, η οποία καταδεικνύει την ικανότητα του εργαστηρίου να επιτυγχάνει αναπαραγώγιμα και ορθά αποτελέσματα με τους θετικούς μάρτυρες. Η επαρκής τεχνική ικανότητα ως προς την LLNA: DA μπορεί να αποδειχθεί με την επίτευξη σταθερών θετικών αποτελεσμάτων με τον θετικό μάρτυρα σε 10 τουλάχιστον ανεξάρτητες δοκιμές που έχουν διεξαχθεί εντός εύλογου χρονικού διαστήματος, δηλαδή μικρότερο από ένα έτος.
13. Πρέπει να συμπεριλαμβάνεται πάντοτε παράλληλη ομάδα θετικού μάρτυρα όταν επέρχονται διαδικαστικές αλλαγές στην LLNA: DA (π.χ. αλλαγή ειδικευμένου προσωπικού, αλλαγή υλικών και/ή αντιδραστηρίων της μεθόδου δοκιμών ή του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται σε αυτή, αλλαγή της προέλευσης των πειραματόζων), οι οποίες πρέπει να τεκμηριώνονται στις εκθέσεις του εργαστηρίου. Πρέπει να εξετάζονται οι επιπτώσεις των αλλαγών αυτών στην επάρκεια της ήδη συγκροτημένης ιστορικής βάσης δεδομένων, προκειμένου να κριθεί αν είναι απαραίτητη η δημιουργία νέας ιστορικής βάσης δεδομένων για την τεκμηρίωση της σταθερότητας των αποτελεσμάτων που προκύπτουν με τους θετικούς μάρτυρες.
14. Οι ερευνητές θα πρέπει να γνωρίζουν ότι η απόφαση για διεξαγωγή περιοδικής και όχι ταυτόχρονης μελέτης με θετικό μάρτυρα επηρεάζει έμμεσα την επάρκεια και τη δυνατότητα αποδοχής των αρνητικών αποτελεσμάτων που προκύπτουν χωρίς παράλληλο θετικό μάρτυρα κατά το μεσοδιάστημα μεταξύ των περιοδικών μελετών με θετικό μάρτυρα. Για παράδειγμα, σε περίπτωση ψευδαρνητικού αποτελέσματος της περιοδικής μελέτης με θετικό μάρτυρα, μπορεί να αμφισβητηθούν τα αρνητικά αποτελέσματα που προέκυψαν για την ελεγχόμενη ουσία κατά το μεσοδιάστημα μεταξύ της τελευταίας αποδεκτής περιοδικής μελέτης με θετικό μάρτυρα και της μη αποδεκτής. Οι συνέπειες αυτές πρέπει να λαμβάνονται επιμελώς υπόψη όταν κρίνεται αν θα συμπεριλαμβάνονται παράλληλοι θετικοί μάρτυρες ή θα διεξάγονται απλώς περιοδικές μελέτες με θετικούς μάρτυρες. Πρέπει επίσης να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης μικρότερου αριθμού ζώων στην παράλληλη ομάδα θετικού μάρτυρα, εφόσον δικαιολογείται από επιστημονική άποψη και το εργαστήριο καταδεικνύει τη δυνατότητα χρήσης μικρότερου αριθμού ποντικών με βάση ειδικά για το ίδιο ιστορικά δεδομένα (22).

15. Παρόλο που ο θετικός μάρτυρας πρέπει να ελέγχεται στον φορέα που είναι γνωστό ότι αποσπά σταθερή απόκριση (π.χ. μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου σε αναλογία 4:1, v/v), ενδέχεται να υπάρχουν περιπτώσεις όπου οι νομοθετικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τη διεξαγωγή δοκιμών και σε μη τυποποιημένο φορέα (κλινικός/χημικός συναφές σκεύασμα) (23). Σε περίπτωση δοκιμής του παράλληλου θετικού μάρτυρα και της ελεγχόμενης ουσίας σε διαφορετικούς φορείς, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται χωριστός μάρτυρας VC για τον παράλληλο θετικό μάρτυρα.
16. Όταν αξιολογούνται ουσίες που ανήκουν σε συγκεκριμένη τάξη χημικών ουσιών ή προκαλούν συγκεκριμένο φάσμα αποκρίσεων, είναι ενδεχομένως χρήσιμες και οι ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης για να καταδειχθεί η ορθή λειτουργία της μεθόδου δοκιμών ως προς την ανίχνευση του δερματικού ευαισθητοποιητικού δυναμικού των συγκεκριμένων ειδών ουσιών. Οι κατάλληλες ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης πρέπει να διαθέτουν τις ακόλουθες ιδιότητες:
- δομική και λειτουργική αναλογία προς την τάξη της ελεγχόμενης ουσίας,
 - γνωστά φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά,
 - δεδομένα τεκμηρίωσης που προέρχονται από την LLNA: DA,
 - δεδομένα τεκμηρίωσης που αφορούν άλλα ζωικά μοντέλα και/ή τον άνθρωπο.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

Αριθμός ζώων και επίπεδα δόσεων

17. Χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τέσσερα ζώα ανά δοσολογική ομάδα, με τρεις τουλάχιστον συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας, συν μια παράλληλη ομάδα αρνητικού μάρτυρα, που υποβάλλεται σε αγωγή μόνο με τον φορέα της ελεγχόμενης ουσίας, και έναν θετικό μάρτυρα (παράλληλο ή πρόσφατο, ανάλογα με την πολιτική που εφαρμόζει το εργαστήριο λαμβάνοντας υπόψη τις παραγράφους 11-15). Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο δοκιμής με πολλαπλές δόσεις της ουσίας που χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας, κυρίως στις περιπτώσεις διαλειπουσών δοκιμών με θετικό μάρτυρα. Η μεταχείριση και η αγωγή των ζώων των ομάδων-μαρτύρων, εκτός του ότι αυτά δεν υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία, πρέπει κατά τα άλλα να είναι πανομοιότυπες με των ζώων των ομάδων αγωγής.
18. Η επιλογή των δόσεων και του φορέα πρέπει να βασίζεται στις συστάσεις των βιβλιογραφικών πηγών (2) και (24). Επιλέγονται κατά κανόνα διαδοχικές δόσεις από κατάλληλη σειρά συγκεντρώσεων, όπως 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % κ.λπ. Η επιλογή της χρησιμοποιούμενης σειράς συγκεντρώσεων πρέπει να συνοδεύεται από επαρκή επιστημονική αιτιολόγηση. Κατά την επιλογή των τριών διαδοχικών συγκεντρώσεων, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλα τα υπάρχοντα τοξικολογικά στοιχεία (π.χ. οξεία τοξικότητα και δερματικός ερεθισμός) και στοιχεία για τη δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας (και/ή ουσιών ανάλογης δομής) που ενδιαφέρουν, έτσι ώστε η υψηλότερη συγκέντρωση να μεγιστοποιεί την έκθεση, χωρίς να προκαλεί συστηματική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος (24) (25). Εάν δεν υπάρχουν τέτοια στοιχεία, μπορεί να χρειάζεται δοκιμή προδιαλογής (βλέπε παράγραφο 21-24).
19. Ο φορέας πρέπει να μην προκαλεί συστηματικά και άλλα σφάλματα στα αποτελέσματα των δοκιμών και να επιλέγεται με γνώμονα τη μεγιστοποίηση της διαλυτότητας, ώστε να προκύπτει η μέγιστη εφικτή συγκέντρωση και, ταυτόχρονα, να σχηματίζεται κατάλληλο διάλυμα/εναιώρημα για την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας. Συνιστώνται οι ακόλουθοι φορείς: μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου (4:1, v/v), N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο, μεθυλαιθυλκετόνη, προπυλενογλυκόλη και διμεθυλοσουλφοξείδιο (6), χωρίς να αποκλείεται η χρήση άλλων, εφόσον παρέχεται επαρκής επιστημονική αιτιολόγηση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να απαιτείται η χρήση, ως πρόσθετου μάρτυρα, ενός κλινικός συναφούς διαλύτη ή του σκευάσματος του εμπορίου με τη μορφή του οποίου διατίθεται στην αγορά η ελεγχόμενη ουσία. Θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη μέριμνα για την ενσωμάτωση των υδρόφιλων ουσιών σε ένα σύστημα φορέα το οποίο διαβρέχει το δέρμα και δεν απορρέει αμέσως, με την προσθήκη κατάλληλων διαλυτοποιητών (π.χ. 1 % Pluronic® L92). Κατά συνέπεια, θα πρέπει να αποφεύγονται οι εξ ολοκλήρου υδατικοί φορείς.
20. Η επεξεργασία λεμφαδένων μεμονωμένων ποντικών επιτρέπει την εκτίμηση της μεταβλητότητας μεταξύ των ζώων και τη στατιστική ανάλυση της διαφοράς μεταξύ των μετρήσεων της ελεγχόμενης ουσίας και των μετρήσεων της ομάδας VC (βλέπε παράγραφο 33). Επιπλέον, η αξιολόγηση της δυνατότητας μείωσης του αριθμού ποντικών της ομάδας θετικού μάρτυρα είναι εφικτή μόνο εφόσον συλλέγονται δεδομένα για μεμονωμένα ζώα (22). Επίσης, ορισμένες ρυθμιστικές Αρχές απαιτούν τη συλλογή δεδομένων για μεμονωμένα ζώα. Η τακτική συλλογή δεδομένων για μεμονωμένα ζώα προσφέρει ένα πλεονέκτημα από πλευράς καλής μεταχείρισης των ζώων, καθώς αποτρέπει την επανάληψη δοκιμών που θα ήταν αναγκαία σε περίπτωση μεταγενέστερης εξέτασης των αποτελεσμάτων τα οποία έχουν προκύψει για την ελεγχόμενη ουσία με έναν τρόπο (π.χ. από συγχωνευμένα δεδομένα για τα ζώα) από ρυθμιστικές αρχές που έχουν άλλες απαιτήσεις (π.χ. δεδομένα για μεμονωμένα ζώα).

Δοκιμή προδιαλογής

21. Όταν δεν υπάρχουν στοιχεία για τον προσδιορισμό της μέγιστης δόσης προς δοκιμή (βλέπε παράγραφο 18), θα πρέπει να εκτελείται δοκιμή προδιαλογής, προκειμένου να καθοριστεί το κατάλληλο επίπεδο δόσης για τη δοκιμή με LLNA: DA. Η δοκιμή προδιαλογής αποσκοπεί στην καθοδήγηση κατά την επιλογή του ανώτατου επιπέδου δόσης το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την κυρίως μελέτη LLNA: BrdU-DA, στις περιπτώσεις που δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με τη συγκέντρωση η οποία επάγει συστηματική τοξικότητα (βλέπε παράγραφο 24) και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος (βλέπε παράγραφο 23). Το ανώτατο επίπεδο δόσης που χρησιμοποιείται στη δοκιμή πρέπει να είναι το 100 % της ελεγχόμενης ουσίας, εάν αυτή είναι υγρή, ή η μέγιστη δυνατή συγκέντρωση, προκειμένου για στερεά ή εναιωρήματα.

22. Η δοκιμή προδιαλογής διεξάγεται στις ίδιες συνθήκες όπως η κυρίως μελέτη LLNA: DA, εκτός από την εκτίμηση του πολλαπλασιασμού στους λεμφαδένες, η οποία παραλείπεται, και τη δυνατότητα μείωσης του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται σε κάθε δοσολογική ομάδα. Προτείνεται η χρήση ενός ή δύο ζώων ανά δοσολογική ομάδα. Όλοι οι ποντικοί εξετάζονται καθημερινά για την ανίχνευση κλινικών σημείων συστηματικής τοξικότητας ή τοπικού ερεθισμού στο σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας. Καταγράφεται το βάρος σώματος πριν από την έναρξη και πριν από τον τερματισμό της δοκιμής (8η ημέρα). Εξετάζονται και τα δύο αυτιά κάθε ποντικού για την ανίχνευση ερυθρήματος, το οποίο βαθμολογείται με τη βοήθεια του πίνακα 1 (25). Μετράται το πάχος των αυτιών με παχύμετρο (π.χ. ψηφιακό μικρόμετρο ή παχύμετρο Peacock Dial) την 1η ημέρα (πριν από τη χορήγηση της δόσης), την 3η ημέρα (περίπου 48 ώρες μετά την πρώτη δόση), την 7η ημέρα (24 ώρες πριν από τον τερματισμό) και την 8η ημέρα. Επιπλέον, το πάχος των αυτιών είναι δυνατόν να προσδιοριστεί την 8η ημέρα με προσδιορισμούς βάρους δείγματος αυτιού λαμβανόμενου με λαβίδα βιοψίας, οι οποίοι πρέπει να εκτελούνται μετά τη θανάτωση των ζώων με ευθανασία. Μια βαθμολογία ερυθρήματος ≥ 3 και/ή η αύξηση του πάχους των αυτιών κατά $\geq 25\%$, σε οποιαδήποτε ημέρα μέτρησης, αποτελούν ενδείξεις υπέρμετρου τοπικού ερεθισμού (26) (27). Ως μέγιστη δόση για την κυρίως μελέτη LLNA: DA επιλέγεται η αμέσως χαμηλότερη δόση στη σειρά συγκεντρώσεων της προδιαλογής (βλέπε παράγραφο 18) η οποία δεν επάγει συστηματική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος.

Πίνακας 1

Βαθμολογία ερυθρήματος

Παρατήρηση	Βαθμολογία
Απουσία ερυθρήματος	0
Πολύ ελαφρό ερύθημα (μόλις αντιληπτό)	1
Περιγεγραμμένο ερύθημα	2
Μέτριο έως σοβαρό ερύθημα	3
Σοβαρό ερύθημα (ερυθρότητα τεύτλων) έως σχηματισμός εσχάρων που εμποδίζει τη διαβάθμιση του ερυθρήματος	4

23. Εκτός από την αύξηση του πάχους των αυτιών κατά 25 % (26) (27), έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση των ερεθιστικών ουσιών κατά την LLNA η στατιστικά σημαντική αύξηση του πάχους των αυτιών των ποντικών που υποβάλλονται σε αγωγή σε σύγκριση με τους ποντικούς-μάρτυρες (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Ωστόσο, η αύξηση του πάχους των αυτιών κατά λιγότερο από 25 %, έστω και αν είναι στατιστικά σημαντική, δεν έχει συσχετιστεί ειδικά με υπέρμετρο ερεθισμό (30) (31) (32) (33) (34).
24. Οι ακόλουθες κλινικές παρατηρήσεις, εντασόμενες σε ολοκληρωμένη εκτίμηση, είναι δυνατόν να αποτελούν ένδειξη συστηματικής τοξικότητας (35) και, κατ' επέκταση, να υποδεικνύουν το ανώτατο επίπεδο δόσης προς χρήση στην κυρίως μελέτη LLNA: DA: αλλαγές στη λειτουργία του νευρικού συστήματος (π.χ. ανόρθωση τριχών, αταξία, τρόμοι, σπασμοί), στη συμπεριφορά (π.χ. επιθετικότητα, αλλαγή όσον αφορά την περιποίηση του σώματος, έντονη μεταβολή της κινητικότητας), στον αναπνευστικό ρυθμό (δηλαδή μεταβολές της συχνότητας και της έντασης των αναπνοών, όπως δύσπνοια, ασθμαίνουσα αναπνοή και ρόγχος), καθώς και στην κατανάλωση τροφής και νερού. Επιπλέον, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στην αξιολόγηση τα σημεία λήθαργου και/ή απουσίας αντίδρασης σε ερεθίσματα και κάθε κλινικό σημείο που υπερβαίνει τον ελαφρό ή στιγμιαίο πόνο και δυσφορία, η μείωση του βάρους σώματος κατά $> 5\%$ μεταξύ 1ης και 8ης ημέρας και η θνησιμότητα. Τα ετοιμοθάνατα ζώα, καθώς και όσα παρουσιάζουν σημεία έντονου πόνου και δυσφορίας, πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία (36).

Πρόγραμμα πειραμάτων της κυρίως μελέτης

25. Το πρόγραμμα πειραμάτων της δοκιμασίας έχει ως εξής:

- 1η ημέρα: Κάθε ζώο ζυγίζεται χωριστά και καταγράφονται το βάρος του και οι ενδεχόμενες κλινικές παρατηρήσεις. Η ραχιαία επιφάνεια κάθε αυτιού επιχρίεται με υδατικό διάλυμα λαυρυλοθειικού νατρίου (SLS) 1 % με τη βοήθεια ψήκτρας εμβαπτιζόμενης στο διάλυμα αυτό, έτσι ώστε να καλύπτεται ολόκληρη η ραχιαία επιφάνεια κάθε αυτιού με 4-5 κινήσεις. Μία ώρα μετά την αγωγή με SLS, τοποθετούνται στη ραχιαία επιφάνεια κάθε αυτιού 25 μ L κατάλληλης αραιώσεως της ελεγχόμενης ουσίας, του φορέα μόνου ή του θετικού μάρτυρα (παράλληλο ή πρόσφατο, ανάλογα με την πολιτική που εφαρμόζει το εργαστήριο λαμβάνοντας υπόψη τις παραγράφους 11-15).
- 2η, 3η και 7η ημέρα: Επαναλαμβάνεται η διαδικασία προκατεργασίας με υδατικό διάλυμα SLS 1 % και εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας όπως την 1η ημέρα.
- 4η, 5η και 6η ημέρα: Καμία αγωγή.
- 8η ημέρα: Καταγράφονται το βάρος κάθε ζώου και οι ενδεχόμενες κλινικές παρατηρήσεις. Περίπου 24 έως 30 ώρες μετά την έναρξη της εφαρμογής κατά την 7η ημέρα, τα ζώα θανατώνονται με ευθανασία. Εκτέμνονται οι αποχετευτικοί ωτικοί λεμφαδένες από κάθε αυτί ποντικού και υποβάλλονται χωριστά σε επεξεργασία με φυσιολογικό ορό στον οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS) ανά ζώο. Λεπτομέρειες και διαγράμματα για την αναγνώριση και την εκτομή των λεμφαδένων παρέχονται στη βιβλιογραφική πηγή (22). Για την περαιτέρω παρακολούθηση της τοπικής απόκρισης του δέρματος κατά την κυρίως μελέτη, το πρωτόκολλο της μπορεί να περιλαμβάνει πρόσθετες παραμέτρους, όπως βαθμολογία του ωτικού ερυθρήματος ή μετρήσεις του πάχους των αυτιών (με τη βοήθεια παχυμέτρου ή με προσδιορισμούς βάρους δείγματος αυτιού λαμβανόμενου με λαβίδα βιοψίας κατά τη νεκροψία).

Παρασκευή κυτταρικών εναιωρημάτων

26. Παρασκευάζεται εναιώρημα μεμονωμένων λεμφοκυττάρων από τους λεμφαδένες που έχουν ληφθεί με αμφοτερόπλευρη εκτομή από κάθε ποντικό, με την τοποθέτηση των λεμφαδένων μεταξύ δύο γυάλινων πλακιδίων και την άσκηση ελαφράς πίεσης ώστε να συνθλιβούν οι αδένες. Αφού επιβεβαιωθεί ο σχηματισμός λεπτού ομοιόμορφου στρώματος του ιστού, διαχωρίζονται τα δύο πλακίδια. Σχηματίζεται εναιώρημα του ιστού και των δύο πλακιδίων σε PBS ως εξής: κάθε πλακίδιο κρατείται υπό κλίση πάνω από το τρυβλίο Petri και εκπλύνεται με PBS, ενώ ταυτόχρονα αφαιρείται ο ιστός από το πλακίδιο με ξέστρο κυττάρων. Εξάλλου, επειδή οι λεμφαδένες των ζώων της ομάδας αρνητικού μάρτυρα είναι μικροί, είναι σημαντικό να εκτελείται η εργασία αυτή με προσοχή ώστε να αποφεύγονται οι τεχνητές επιδράσεις στις τιμές του SI. Για την έκπλυση των δύο πλακιδίων πρέπει να χρησιμοποιείται συνολικός όγκος 1 mL PBS. Το εναιώρημα λεμφοκυττάρων στο τρυβλίο Petri πρέπει να ομοιογενοποιείται ελαφρά με το ξέστρο κυττάρων. Στη συνέχεια, λαμβάνεται με μικροσιφόνιο ποσότητα 20 μL του εναιωρήματος λεμφοκυττάρων —με προσοχή ώστε να μην αναρροφηθεί η ορατή μεμβράνη— και αναμειγνύεται με 1,98 mL PBS για να προκύψει δείγμα όγκου 2 mL. Παρασκευάζεται έπειτα ένα δεύτερο δείγμα 2 mL με την ίδια διαδικασία, ώστε να αντιστοιχούν δύο δείγματα σε κάθε ζώο.

Προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (μέτρηση της περιεκτικότητας των λεμφοκυττάρων σε ATP)

27. Η αύξηση της περιεκτικότητας των λεμφοκυττάρων σε ATP μετράται με τη μέθοδο της λουσιφερίνης/λουσιφεράσης με τη βοήθεια συνόλου αντιδραστηρίων (kit) για τη μέτρηση ATP, το οποίο προσδιορίζει τη βιοφωταύγεια σε σχετικές μονάδες φωταύγειας (RLU). Η διάρκεια της δοκιμασίας, από τον χρόνο θανάτωσης των ζώων μέχρι τη μέτρηση της περιεκτικότητας σε ATP για το καθένα, πρέπει να διατηρείται σταθερή και να μην υπερβαίνει τα 30 λεπτά περίπου, καθώς θεωρείται ότι η περιεκτικότητα σε ATP μειώνεται σταδιακά με την πάροδο του χρόνου μετά τη θανάτωση των ζώων (12). Συνεπώς, η σειρά διαδικασιών που αρχίζει με την εκτομή των ωτικών λεμφαδένων και τελειώνει με τη μέτρηση της ATP πρέπει να ολοκληρώνεται εντός 20 λεπτών σύμφωνα με το προκαθορισμένο χρονοδιάγραμμα, που είναι το ίδιο για όλα τα ζώα. Μετράται η φωταύγεια ATP καθενός από τα δείγματα των 2 mL ώστε να λαμβάνονται συνολικά δύο μετρούμενες τιμές ATP για κάθε ζώο. Στη συνέχεια προσδιορίζεται η μέση τιμή φωταύγειας λόγω ATP, η οποία χρησιμοποιείται στους μετέπειτα υπολογισμούς (βλέπε παράγραφο 30).

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ**Κλινικές παρατηρήσεις**

28. Κάθε ποντικός πρέπει να εξετάζεται με προσοχή, τουλάχιστον μία φορά ημερησίως, για την ανίχνευση κλινικών σημείων είτε τοπικού ερεθισμού στο σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας είτε συστημικής τοξικότητας. Όλες οι παρατηρήσεις καταγράφονται συστηματικά σε χωριστό αρχείο για κάθε ποντικό. Τα σχέδια παρακολούθησης πρέπει να περιλαμβάνουν κριτήρια για τον ταχύ εντοπισμό, με σκοπό την ευθανασία, των ποντικών που εμφανίζουν συστημική τοξικότητα ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό ή διάβρωση του δέρματος (36).

Βάρος σώματος

29. Όπως αναφέρεται στην παράγραφο 25, το βάρος κάθε ζώου πρέπει να μετράται κατά την έναρξη της δοκιμής και κατά τον προγραμματισμένο χρόνο ευθανασίας.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

30. Τα αποτελέσματα για κάθε ομάδα αγωγής εκφράζονται σε μέση τιμή SI. Ο SI προκύπτει με διαίρεση της μέσης τιμής RLU/ποντικό κάθε ομάδας αγωγής με την ελεγχόμενη ουσία, όπως επίσης και της ομάδας θετικού μάρτυρα, διά της μέσης τιμής RLU/ποντικό της ομάδας που υποβλήθηκε σε αγωγή με τον διαλύτη/ομάδας VC. Στην περίπτωση αυτή, ο μέσος SI για τις ομάδες VC ισούται με τη μονάδα.

31. Στη διαδικασία λήψης απόφασης, ένα αποτέλεσμα θεωρείται θετικό όταν $SI \geq 1,8$ (10). Ωστόσο, όταν κρίνεται αν ένα οριακό αποτέλεσμα (δηλαδή τιμή SI από 1,8 έως 2,5) θα χαρακτηριστεί ή όχι θετικό, μπορούν επίσης να χρησιμοποιούνται η ισχύς της σχέσης δόσης-απόκρισης, η στατιστική σημαντικότητα και η σταθερότητα των αποκρίσεων των μαρτύρων που υποβάλλονται σε αγωγή με τον διαλύτη/φορέα και των θετικών μαρτύρων (2) (3) (37).

32. Προκειμένου να επιβεβαιώσουν οι χρήστες ότι μια οριακή θετική απόκριση με SI από 1,8 έως 2,5 αποτελεί θετικό αποτέλεσμα, μπορεί να επιθυμούν να λάβουν υπόψη τις τιμές του SI σε συνδυασμό με συμπληρωματικές πληροφορίες, όπως η σχέση δόσης-απόκρισης, τα στοιχεία συστημικής τοξικότητας ή υπέρμετρου ερεθισμού και, εφόσον ενδείκνυται, η στατιστική σημαντικότητα (10). Θα πρέπει επίσης να συνεκτιμώνται διάφορες ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας, μεταξύ των οποίων το κατά πόσον έχει δομική σχέση με γνωστές ευαισθητοποιητικές για το δέρμα ουσίες, το κατά πόσον προκαλεί υπέρμετρο ερεθισμό του δέρματος του ποντικού και το είδος της σχέσης δόσης-απόκρισης που παρατηρήθηκε. Αυτά και άλλα κριτήρια αναλύονται στη βιβλιογραφική πηγή (4).

33. Η συλλογή δεδομένων σε επίπεδο μεμονωμένου ποντικού καθιστά δυνατή τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων για τη διαπίστωση της ύπαρξης σχέσης δόσης-απόκρισης και του βαθμού της σχέσης αυτής. Η ενδεχόμενη στατιστική εκτίμηση θα μπορούσε να περιλαμβάνει αξιολόγηση της σχέσης δόσης-απόκρισης, καθώς και κατάλληλα προσαρμοσμένες συγκρίσεις των ομάδων δοκιμής (π.χ. συγκρίσεις κατά ζεύγη μεταξύ της ομάδας που λαμβάνει τη δόση και της παράλληλης ομάδας-μάρτυρα που λαμβάνει τον διαλύτη/φορέα). Οι στατιστικές αναλύσεις είναι δυνατόν να περιλαμβάνουν, λόγω χάριν, γραμμική παλινδρόμηση ή δοκιμή William για την εκτίμηση των τάσεων της απόκρισης σε σχέση με τη δόση και δοκιμή Dunnett για τις συγκρίσεις κατά ζεύγη. Κατά την επιλογή της ενδεδειγμένης μεθόδου στατιστικής ανάλυσης, ο ερευνητής θα πρέπει να έχει επίγνωση των πιθανών άνωθεν διακυμάνσεων (διασπορών) και άλλων συναφών προβλημάτων τα οποία ενδέχεται να επιβάλλουν μετασχηματισμό των δεδομένων ή μη παραμετρική στατιστική ανάλυση. Σε κάθε περίπτωση, ενδέχεται να χρειαστεί να εκτελέσει ο ερευνητής υπολογισμούς του SI και στατιστικές αναλύσεις με και χωρίς ορισμένα σημεία δεδομένων (καλούμενα μερικές φορές "έκτροπες τιμές").

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ

Δεδομένα

34. Τα δεδομένα πρέπει να συγκεφαλαιώνονται με τη μορφή πίνακα, στον οποίο εμφανίζονται η τιμή RLU για κάθε ζώο, η ομαδική μέση τιμή RLU/ζώο, η σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM) και η μέση τιμή του SI για κάθε δοσολογική ομάδα σε σύγκριση με την παράλληλη ομάδα-μάρτυρα που υποβλήθηκε σε αγωγή με τον διαλύτη/φορέα.

Έκθεση δοκιμής

35. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιέχει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη χημική ουσία και μάρτυρες:

- στοιχεία ταυτότητας (π.χ. αριθ. CAS και EC, εφόσον υπάρχουν, πηγή, καθαρότητα, γνωστές προσμίξεις, αριθμός παρτίδας),
- σύσταση και φυσικές και χημικές ιδιότητες (π.χ. πτητικότητα, σταθερότητα, διαλυτότητα),
- προκειμένου για μείγματα, σύνθεση και εκατοστιαία αναλογία των συστατικών.

Διαλύτης/φορέας:

- στοιχεία ταυτότητας (καθαρότητα, συγκέντρωση, κατά περίπτωση, όγκος που χρησιμοποιήθηκε),
- αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα.

Ζώα της δοκιμής:

- προέλευση των ποντικών της φυλής CBA,
- μικροβιολογική κατάσταση των ζώων, εφόσον είναι γνωστή,
- αριθμός και ηλικία των ζώων,
- προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.

Συνθήκες δοκιμής:

- προέλευση, αριθμός παρτίδας και δεδομένα του κατασκευαστή για τον ποιοτικό έλεγχο/διασφάλιση ποιότητας του συνόλου αντιδραστηρίων (kit) για ATP,
- λεπτομέρειες για την παρασκευή και εφαρμογή του δείγματος της ελεγχόμενης ουσίας,
- αιτιολόγηση της επιλογής των δόσεων (συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων της δοκιμής προδιαλογής, εφόσον έχει διεξαχθεί),
- συγκεντρώσεις φορέα και ελεγχόμενης ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν και συνολική ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας που χορηγήθηκε,
- λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού (μεταξύ άλλων, τύπος/προέλευση του σιτηρεσίου, προέλευση του νερού),
- λεπτομέρειες για τα προγράμματα αγωγής και δειγματοληψίας,
- μέθοδοι μέτρησης της τοξικότητας,
- κριτήρια χαρακτηρισμού της μελέτης ως θετικής ή αρνητικής,
- λεπτομέρειες για τυχόν παρεκκλίσεις από το πρωτόκολλο και επεξήγηση του τρόπου με τον οποίο αυτές επηρεάζουν τον σχεδιασμό και τα αποτελέσματα της μελέτης.

Έλεγχος αξιοπιστίας:

- περίληψη των αποτελεσμάτων του πιο πρόσφατου ελέγχου αξιοπιστίας, συμπεριλαμβανομένων πληροφοριών σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, τη συγκέντρωση και τον φορέα που χρησιμοποιήθηκε,

- δεδομένα του εργαστηρίου δοκιμών που αφορούν τον παράλληλο και/ή ιστορικό θετικό μάρτυρα και τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα (αγωγή με τον διαλύτη/φορέα),
- εάν δεν συμπεριελήφθη στη δοκιμή παράλληλος θετικός μάρτυρας, ημερομηνία διεξαγωγής της πιο πρόσφατης περιοδικής δοκιμής με θετικό μάρτυρα και σχετική έκθεση του εργαστηρίου, καθώς και έκθεση με λεπτομερή ιστορικά δεδομένα του εργαστηρίου για τον θετικό μάρτυρα που δικαιολογούν την απόφαση να μη συμπεριληφθεί παράλληλος θετικός μάρτυρας.

Αποτελέσματα:

- βάρος κάθε ποντικού κατά την έναρξη της χορήγησης των δόσεων και κατά τον προγραμματισμένο χρόνο θανάτωσης, καθώς και μέση τιμή και σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM) για κάθε ομάδα αγωγής,
- για κάθε ζώο, χρόνος εκδήλωσης και εξέλιξη των σημείων τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένου τυχόν ερεθισμού του δέρματος στο σημείο χορήγησης,
- για κάθε ζώο, χρόνος θανάτωσης και χρόνος μέτρησης της ATP,
- πίνακας με τις τιμές RLU ανά ποντικό και τις τιμές SI για κάθε δοσολογική ομάδα αγωγής,
- για κάθε ομάδα αγωγής, μέση τιμή RLU/ποντικό και σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM), καθώς και τα αποτελέσματα της ανάλυσης έκτροπων τιμών,
- υπολογισμένος SI και κατάλληλο μέτρο μεταβλητότητας στο οποίο συνεκτιμάται η μεταβλητότητα μεταξύ των ζώων, τόσο της ομάδας που υποβάλλεται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία, όσο και των ομάδων-μαρτύρων,
- σχέση δόσης-απόκρισης,
- στατιστικές αναλύσεις, κατά περίπτωση.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων:

- σύντομος σχολιασμός των αποτελεσμάτων, της ανάλυσης της σχέσης δόσης-απόκρισης και, κατά περίπτωση, των στατιστικών αναλύσεων, με γνωμάτευση για τον χαρακτηρισμό ή μη της ελεγχόμενης ουσίας ως ευαισθητοποιητικής για το δέρμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 999-1002.
- (3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 985-997.
- (4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-333.
- (5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.
- (6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Διατίθεται στον ιστότοπο: [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. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<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. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPrept2009.pdf].
- (12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10.
- (13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26.
- (14) OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- (16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- (17) Crouch, S.P., Kozłowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.*, 160, 81-88.
- (18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth.*, 72, 127-132.
- (19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27-34.
- (20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol.*, 305, 346-370.
- (21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]
- (23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (25) OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

- (26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- (27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fdLLNA/BRDcomplete.pdf>].
- (28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- (31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- (32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.
- (33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [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. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563-79.
- (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. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: η εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί μέτρο των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την "συμφωνία" για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (38).

Ουσία συγκριτικής αξιολόγησης: ουσία, ευαισθητοποιητική ή μη, που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για σύγκριση με ελεγχόμενη ουσία. Μια ουσία συγκριτικής αξιολόγησης πρέπει να διαθέτει τις ακόλουθες ιδιότητες: i) σταθερή(-ές) και αξιόπιστη(-ες) προέλευση(-εις), ii) δομική και λειτουργική αναλογία προς την τάξη των ελεγχόμενων ουσιών, iii) γνωστά φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά, iv) δεδομένα τεκμηρίωσης γνωστών επιδράσεων και (v) γνωστή ισχύ στο εύρος της επιθυμητής απόκρισης.

Ψευδαρνητικό αποτέλεσμα: ο εσφαλμένος χαρακτηρισμός ουσίας ως αρνητικής ή μη δραστηκής με μέθοδο δοκιμών, ενώ στην πραγματικότητα είναι θετική ή δραστηκή.

Ψευδοθετικό αποτέλεσμα: ο εσφαλμένος χαρακτηρισμός ουσίας ως θετικής ή δραστηκής με δοκιμή, ενώ στην πραγματικότητα είναι αρνητική ή μη δραστηκή.

Κίνδυνος: το δυναμικό δυσμενούς επίδρασης στην υγεία ή στο περιβάλλον. Η δυσμενής επίδραση εκδηλώνεται μόνο εάν τα επίπεδα έκθεσης είναι επαρκή.

Διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: μέτρο του βαθμού στον οποίο διαφορετικά ειδικευμένα εργαστήρια μπορούν να επιτυγχάνουν ποιοτικά και ποσοτικά παραπλήσια αποτελέσματα, χρησιμοποιώντας το ίδιο πρωτόκολλο και υποβάλλοντας σε δοκιμή τις ίδιες ελεγχόμενες ουσίες. Η διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα προσδιορίζεται κατά τις διαδικασίες προεπικύρωσης και επικύρωσης και αποτελεί ένδειξη του κατά πόσον υπάρχει δυνατότητα επιτυχούς μεταφοράς μιας δοκιμής μεταξύ εργαστηρίων· καλείται επίσης “αναπαραγωγιμότητα μεταξύ εργαστηρίων” (38).

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: προσδιορισμός του βαθμού στον οποίο ειδικευμένα άτομα μπορούν να επαναλάβουν με επιτυχία τα ίδια αποτελέσματα εντός του ίδιου εργαστηρίου, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο πρωτόκολλο σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Καλείται επίσης “αναπαραγωγιμότητα εντός του εργαστηρίου” (38).

Έκτροπη τιμή: έκτροπη τιμή (outlier) είναι μια παρατήρηση σε τυχαίο δείγμα πληθυσμού η οποία διαφέρει σημαντικά από άλλες τιμές αυτού του δείγματος.

Διασφάλιση ποιότητας: διαχειριστική διαδικασία με την οποία αξιολογούνται, από άτομα ανεξάρτητα από εκείνα που εκτελούν τις δοκιμές, η τήρηση των προτύπων, των απαιτήσεων και των διαδικασιών τήρησης αρχείων που αφορούν τις εργαστηριακές δοκιμές, καθώς και η ορθότητα της μεταφοράς δεδομένων.

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (38).

Δερματική ευαισθητοποίηση: ανοσολογική διαδικασία που είναι αποτέλεσμα της τοπικής έκθεσης ευπαθούς ατόμου σε επαγωγικό χημικό αλλεργιογόνο, το οποίο προκαλεί δερματική ανοσοαπόκριση που μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ευαισθητοποίησης εξ επαφής.

Δείκτης διέγερσης (SI): αριθμητική τιμή η οποία υπολογίζεται προκειμένου να εκτιμηθεί το δερματικό ευαισθητοποιητικό δυναμικό μιας ελεγχόμενης ουσίας και ισούται με την αναλογία του πολλαπλασιασμού στις ομάδες που υποβάλλονται σε αγωγή με την ουσία προς τον πολλαπλασιασμό στην ομάδα-μάρτυρα που υποβάλλεται ταυτόχρονα σε αγωγή με τον φορέα.

Ελεγχόμενη ουσία (καλούμενη επίσης “ελεγχόμενη χημική ουσία”): κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

B.51. ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΡΜΑΤΟΣ: ΤΟΠΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΛΕΜΦΑΔΕΝΩΝ: BRDU-ELISA

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Οι κατευθυντήριες γραμμές του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών με χημικές ουσίες και οι μέθοδοι δοκιμών της ΕΕ επανεξετάζονται κατά περιόδους με βάση την επιστημονική πρόοδο, τις μεταβαλλόμενες ανάγκες κανονιστικής ρύθμισης και τον προβληματισμό όσον αφορά την καλή μεταχείριση των ζώων. Η πρώτη μέθοδος δοκιμών (B.42) για τον προσδιορισμό της ευαισθητοποίησης του δέρματος σε ποντικούς, δηλαδή η τοπική δοκιμασία λεμφαδένων (LLNA – κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 429) αναθεωρήθηκε (1 και κεφάλαιο B.42 του παρόντος παραρτήματος). Έχουν δημοσιευθεί λεπτομερείς περιγραφές της επικύρωσης της LLNA, καθώς και επισκόπηση των σχετικών εργασιών (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Στην LLNA χρησιμοποιείται ραδιενεργός θυμιδίνη ή ραδιενεργό ιώδιο για τη μέτρηση του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η χρήση της δοκιμασίας όταν υπάρχουν προβλήματα προμήθειας, χρήσης ή τελικής διάθεσης ραδιοϊσοτόπων. Η μέθοδος LLNA: BrdU-ELISA [Enzyme-Linked Immunosorbent Assay/δοκιμασία ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού] αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου δοκιμών LLNA που δεν απαιτεί ραδιενέργεια και στην οποία χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων μη ραδιοσημασμένη 5-βρωμο-2-δεσοξουριδίνη (BrdU) (αριθ. Chemical Abstracts Service [CAS] 59-14-3) σε ένα σύστημα δοκιμής βασισμένο στην τεχνική ELISA. Η LLNA: BrdU-ELISA επικυρώθηκε, επανεξετάστηκε και συνιστάται από διεθνή ανεξάρτητη επιστημονική επιτροπή αξιολόγησης από ομότιμους κριτές, καθώς θεωρείται χρήσιμη για την αναγνώριση των ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών για το δέρμα χημικών ουσιών, με ορισμένους περιορισμούς (10) (11) (12). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών σχεδιάστηκε για την εκτίμηση του δερματικού ευαισθητοποιητικού δυναμικού των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) στα ζώα. Το κεφάλαιο B.6 του παρόντος παραρτήματος και η κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 406 συνίστανται σε δοκιμές σε ινδικά χοιρίδια, συγκεκριμένα στη δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικά χοιρίδια και τη δοκιμή Buehler (13). Τόσο η LLNA (κεφάλαιο B.42 του παρόντος παραρτήματος, OECD Test Guideline 429), όσο και οι δύο τροποποιήσεις της που δεν απαιτούν ραδιενέργεια – LLNA: BrdU-ELISA (κεφάλαιο B.51 του παρόντος παραρτήματος, OECD Test Guideline 442 B) και LLNA: DA (κεφάλαιο B.50 του παρόντος παραρτήματος, OECD Test Guideline 442 A) – προσφέρουν πλεονέκτημα έναντι των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια που περιγράφονται στο κεφάλαιο B.6 και στην κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 406 (13) όσον αφορά τον περιορισμό και τη βελτίωση της χρήσης ζώων.

2. Η LLNA: BrdU-ELISA, όπως και η LLNA, μελετά την επαγωγική φάση της δερματικής ευαισθητοποίησης και παρέχει κατάλληλα ποσοτικά δεδομένα για την εκτίμηση της σχέσης δόσης-απόκρισης. Επιπλέον, η ικανότητα ανίχνευσης των ευαισθητοποιητικών για το δέρμα ουσιών χωρίς να χρειάζεται ραδιοσημάνση για το DNA αποκλείει το ενδεχόμενο επαγγελματικής έκθεσης σε ραδιενέργεια και αίρει τα προβλήματα διάθεσης των αποβλήτων. Αυτό παρέχει τη δυνατότητα αύξησης της χρήσης ποντικών για την ανίχνευση των ευαισθητοποιητικών για το δέρμα ουσιών, χάρη στην οποία θα μπορούσε να περιοριστεί περαιτέρω η χρήση ινδικών χοιριδίων σε δοκιμές για τη διαπίστωση του δυναμικού δερματικής ευαισθητοποίησης (κεφάλαιο B.6, OECD Test Guideline 406) (13).

ΟΡΙΣΜΟΙ

3. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

4. Η LLNA: BrdU-ELISA αποτελεί τροποποιημένη μέθοδο LLNA για την αναγνώριση χημικών ουσιών που πιθανώς προκαλούν δερματική ευαισθητοποίηση, με συγκεκριμένους περιορισμούς. Αυτό δεν σημαίνει κατ' ανάγκη ότι η LLNA: BrdU-ELISA πρέπει να χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση αντί της LLNA ή των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια (κεφάλαιο B.6, OECD Test Guideline 406) (13) αλλά μάλλον ότι είναι εφάμιλλη των τελευταίων και μπορεί να χρησιμοποιείται ως εναλλακτική λύση, η οποία κατά κανόνα δεν απαιτεί περαιτέρω επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, θετικών και αρνητικών (10) (11). Πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης, το εργαστήριο δοκιμών πρέπει να λαμβάνει υπόψη όλα τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, μεταξύ των οποίων την ταυτότητα και τη χημική δομή της, τις φυσικές και χημικές ιδιότητές της, τα αποτελέσματα τυχόν άλλων δοκιμών τοξικότητας της ουσίας, in vitro ή in vivo, και τα τοξικολογικά δεδομένα του αφορούν χημικά προϊόντα ανάλογης δομής. Τα στοιχεία αυτά θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη προκειμένου να κριθεί αν η LLNA: BrdU-ELISA είναι κατάλληλη για την ελεγχόμενη ουσία (με δεδομένη την ασμβατότητα περιορισμένου αριθμού ειδών χημικών προϊόντων με την LLNA: BrdU-ELISA —βλέπε παράγραφο 5) και ως βοήθημα κατά την επιλογή δόσεων.
5. Η LLNA: BrdU-ELISA είναι μέθοδος in vivo και, επομένως, δεν καταργεί τη χρήση ζώων στην εκτίμηση της δραστηριότητας αλλεργικής ευαισθητοποίησης εξ επαφής. Είναι ωστόσο ικανή να περιορίσει τη χρήση ζώων για τον σκοπό αυτό, σε σύγκριση με τις δοκιμές σε ινδικά χοιρίδια (κεφάλαιο B.6, OECD Test Guideline 406) (13). Επιπλέον, η LLNA: BrdU-ELISA βελτιώνει ουσιαστικά τον τρόπο με τον οποίο χρησιμοποιούνται τα ζώα στις δοκιμές αλλεργικής ευαισθητοποίησης εξ επαφής, δεδομένου ότι, σε αντίθεση με τη μέθοδο δοκιμών B.6 και την κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 406, δεν απαιτεί την εκδήλωση των επαγόμενων από το ερέθισμα αντιδράσεων δερματικής υπερευαισθησίας. Επίσης, η LLNA: BrdU-ELISA δεν απαιτεί τη χρήση ανοσοενισχυτικών, όπως η δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικά χοιρίδια (κεφάλαιο B.6 του παρόντος παραρτήματος, 13). Κατ' αυτόν τον τρόπο, η LLNA: BrdU-ELISA περιορίζει τη δυσφορία των ζώων. Παρά τα πλεονεκτήματα της LLNA: BrdU-ELISA έναντι των μεθόδων B.6 και OECD Test Guideline 406 (13), υπάρχουν ορισμένοι περιοριστικοί παράγοντες που ενδέχεται να επιβάλλουν τη χρήση των B.6 και OECD Test Guideline 406 (π.χ. δοκιμές με ορισμένα μέταλλα, ψευδοθετικά ευρήματα με ορισμένες ερεθιστικές για το δέρμα ουσίες [όπως ορισμένα επιφανειοδραστικά χημικά προϊόντα] (6) (1 και κεφάλαιο B.42 του παρόντος παραρτήματος), η διαλυτότητα της ελεγχόμενης ουσίας). Επιπροσθέτως, η χρήση των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια (μέθοδος B.6, OECD Test Guideline 406) (13) ενδέχεται να καταστεί αναγκαία στην περίπτωση χημικών ουσιών ή τάξεων χημικών ουσιών που περιέχουν δραστικές ομάδες οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να αποτελέσουν συγχυτικούς παράγοντες (15). Οι περιορισμοί που έχουν προσδιοριστεί για την LLNA (1 και κεφάλαιο B.42 του παρόντος παραρτήματος) συνιστάται να ισχύουν και για την LLNA: BrdU-ELISA (10). Εκτός αυτών των εντοπισθέντων περιορισμών, θεωρείται ότι η LLNA: BrdU-ELISA μπορεί να εφαρμοστεί στις δοκιμές οποιασδήποτε χημικής ουσίας, εκτός εάν αυτή έχει ιδιότητες που ενδέχεται να επηρεάσουν την ορθότητα της μεθόδου. Επιπροσθέτως, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πιθανότητα οριακών θετικών αποτελεσμάτων όταν οι τιμές του δείκτη διέγερσης (SI) κυμαίνονται από 1,6 έως 1,9 (βλέπε παραγράφους 31-32). Αυτό στηρίζεται στη βάση δεδομένων επικύρωσης για 43 ουσίες με τη χρήση SI $\geq 1,6$ (βλέπε παράγραφο 6), από τις οποίες αναγνωρίστηκαν σωστά με την LLNA: BrdU-ELISA και οι 32 ευαισθητοποιητικές βάσει της LLNA, αλλά δεν αναγνωρίστηκαν σωστά 2 από τις 11 μη ευαισθητοποιητικές βάσει της LLNA ουσίες με τιμές SI μεταξύ 1,6 και 1,9 (δηλαδή οριακό θετικό αποτέλεσμα) (10). Επειδή, ωστόσο, χρησιμοποιήθηκε η ίδια σειρά δεδομένων για τον καθορισμό των τιμών του SI και για τον υπολογισμό των προγνωστικών ιδιοτήτων της δοκιμής, τα αναφερόμενα αποτελέσματα μπορεί να συνιστούν υπερεκτίμηση των πραγματικών προγνωστικών ιδιοτήτων.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

6. Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η LLNA: BrdU-ELISA είναι ότι οι ευαισθητοποιητικές ουσίες επάγουν πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων των λεμφαδένων που αποχετεύουν το σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας. Ο πολλαπλασιασμός αυτός είναι ανάλογος με τη δόση και με την ισχύ του εφαρμοζόμενου αλλεργιογόνου και αποτελεί ένα απλό μέσο αντικειμενικής, ποσοτικής μέτρησης της ευαισθητοποίησης. Μετράται με σύγκριση του αριθμητικού μέσου του πολλαπλασιασμού σε κάθε ομάδα δοκιμής προς τον αριθμητικό μέσο του πολλαπλασιασμού στην ομάδα-μάρτυρα που έχει υποβληθεί σε αγωγή με τον φορέα (VC). Προσδιορίζεται ο λόγος του αριθμητικού μέσου του πολλαπλασιασμού σε κάθε ομάδα που υποβάλλεται σε αγωγή προς την αντίστοιχη τιμή για την παράλληλη ομάδα VC, ο οποίος καλείται δείκτης διέγερσης (SI) και πρέπει να είναι $\geq 1,6$ ώστε να δικαιολογείται η περαιτέρω αξιολόγηση μιας ελεγχόμενης ουσίας ως δυνητικά ευαισθητοποιητικής για το δέρμα. Οι διαδικασίες που περιγράφονται στο παρόν κεφάλαιο βασίζονται στη χρήση της μετρούμενης περιεκτικότητας σε BrdU ως ένδειξης αυξημένου αριθμού πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων στους αποχετευτικούς ωτικούς λεμφαδένες. Η BrdU είναι ένωση ομοειδής με τη θυμιδίνη και ενσωματώνεται με παρόμοιο τρόπο στο DNA των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων. Η ενσωμάτωση της BrdU μετράται με την τεχνική ELISA, στην οποία χρησιμοποιείται ένα εξειδικευμένο αντίσωμα για τη BrdU, σηματοδοτούμενο με υπεροξειδάση. Με την προσθήκη του υποστρώματος, η υπεροξειδάση αντιδρά με αυτό προς σχηματισμό έγχρωμου προϊόντος το οποίο προσδιορίζεται ποσοτικά μέσω της ειδικής απορρόφησης, με τη χρήση συσκευής ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Επιλογή ζωικού είδους

7. Το είδος που έχει επιλεγεί για τη συγκεκριμένη δοκιμή είναι ο ποντικός. Οι μελέτες επικύρωσης της LLNA: BrdU-ELISA διεξήχθησαν αποκλειστικά σε ποντικούς της φυλής CBA/J, η οποία κατά συνέπεια θεωρείται προτιμώμενη (10) (12). Χρησιμοποιούνται νεαροί ενήλικες θηλυκοί ποντικοί που δεν έχουν ποτέ γεννήσει ούτε εγκυμονούν. Κατά την έναρξη της μελέτης, η ηλικία των ζώων πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 8 και 12 εβδομάδων και οι διαφορές βάρους μεταξύ τους πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το 20 % της μέσης τιμής. Εναλλακτικά, είναι δυνατή η χρήση άλλων φυλών, καθώς και αρσενικών ζώων, εφόσον έχουν συγκεντρωθεί επαρκή δεδομένα από τα οποία προκύπτει ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές απόκρισης κατά την LLNA: BrdU-ELISA, οφειλόμενες ειδικά στη φυλή και/ή το φύλο.

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

8. Οι ποντικοί πρέπει να στεγάζονται σε ομάδες (16), εκτός εάν η ατομική στέγασή τους δικαιολογείται με επαρκή επιστημονική αιτιολόγηση. Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων πρέπει να είναι 22 ± 3 °C. Αν και η σχετική υγρασία πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εντούτοις ο στόχος θα πρέπει να είναι μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12ώρου. Για τη διατροφή επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού.

Προετοιμασία των ζώων

9. Τα ζώα επιλέγονται τυχαία, σημαίνονται με τρόπο που επιτρέπει την αναγνώριση του καθενός (αλλά όχι με αναγνωριστικό ενώτιο οποιασδήποτε μορφής) και παραμένουν στους κλωβούς τους τουλάχιστον για πέντε ημέρες πριν από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων, ώστε να εγκλιματιστούν στις εργαστηριακές συνθήκες. Πριν από την έναρξη της αγωγής, εξετάζονται όλα τα ζώα για να είναι βέβαιο ότι δεν παρουσιάζουν εμφανείς βλάβες του δέρματος.

Παρασκευή των διαλυμάτων δοσολογίας

10. Πριν από την εφαρμογή στο αυτί ποντικού, τα στερεά χημικά προϊόντα πρέπει να διαλύονται, ή να σχηματίζεται εναιώρημά τους, σε κατάλληλους διαλύτες/φορείς και να αραιώνονται, εφόσον ενδείκνυται. Τα υγρά χημικά προϊόντα μπορούν να εφαρμόζονται ως έχουν ή να αραιώνονται πριν από τη χορήγηση. Τα αδιάλυτα χημικά προϊόντα, όπως αυτά που συναντώνται συνήθως στα ιατροτεχνολογικά είδη, πρέπει να υποβάλλονται σε εξαντλητική εκχύλιση με κατάλληλο διαλύτη, ώστε να παραλαμβάνονται όλα τα εκχυλίσματα συστατικά για δοκιμή, πριν από την εφαρμογή στο αυτί ποντικού. Τα παρασκευάσματα της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να ανανεώνονται καθημερινά, εκτός εάν η φύλαξή τους είναι αποδεκτή βάσει των σχετικών με τη σταθερότητα στοιχείων.

Έλεγχος αξιοπιστίας

11. Χρησιμοποιούνται χημικά προϊόντα ως θετικοί μάρτυρες για να καταδειχθεί η ορθή εκτέλεση της δοκιμασίας με την απόκριση, με επαρκή και αναπαραγώγιμη ευαισθησία, σε ευαισθητοποιητική ελεγχόμενη ουσία για την οποία έχει χαρακτηριστεί επακριβώς το μέγεθος της απόκρισης. Συνιστάται η συμπεριληψη παράλληλου θετικού μάρτυρα επειδή καταδεικνύει την ικανότητα του εργαστηρίου να εκτελεί με επιτυχία κάθε δοκιμασία και καθιστά δυνατή την εκτίμηση της ενδοεργαστηριακής και διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και συγκρισιμότητας. Επίσης, καθώς ορισμένες ρυθμιστικές Αρχές απαιτούν τη χρήση θετικού μάρτυρα σε κάθε μελέτη, συνιστάται στους χρήστες να ζητούν τη γνώμη των αρμόδιων αρχών πριν από τη διεξαγωγή της LLNA: BrdU-ELISA. Συνιστάται, επομένως, η χρήση παράλληλου θετικού μάρτυρα ως συνήθης πρακτική, ώστε να μην χρειάζονται πρόσθετες δοκιμές σε ζώα για την κάλυψη των αναγκών που μπορεί να δημιουργήσει η περιοδική χρήση θετικών μαρτύρων (βλέπε παράγραφο 12). Ένας θετικός μάρτυρας θα πρέπει να δίδει θετική απόκριση κατά την LLNA: BrdU-ELISA σε επίπεδα έκθεσης τα οποία αναμένεται να προκαλέσουν αύξηση του SI σε τιμή $\geq 1,6$ σε σύγκριση με την ομάδα αρνητικού μάρτυρα. Η δόση για τον θετικό μάρτυρα πρέπει να επιλέγεται κατά τρόπο ώστε να μην προκαλεί υπέρμετρο ερεθισμό του δέρματος ή συστηματική τοξικότητα και η επαγωγή να είναι αναπαραγώγιμη αλλά όχι υπερβολική (δηλαδή οι τιμές SI > 14 θεωρούνται υπέρμετρες). Οι προτιμώμενοι θετικοί μάρτυρες είναι το διάλυμα εξυλοκινναμωμικής αλδεύδης (αριθ. CAS 101-86-0) 25 % και το διάλυμα ευγενόλης (αριθ. CAS 97-53-0) 25 % σε μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου (4:1, v/v). Σε ορισμένες, δεόντως αιτιολογημένες περιπτώσεις, μπορούν να χρησιμοποιούνται άλλοι θετικοί μάρτυρες που πληρούν τα προαναφερόμενα κριτήρια.
12. Παρά τη σύσταση για συμπεριληψη παράλληλης ομάδας θετικού μάρτυρα, σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να αρκεί η περιοδική δοκιμή του θετικού μάρτυρα (δηλαδή ανά διαστήματα που δεν υπερβαίνουν το εξάμηνο) για εργαστήρια που εκτελούν τακτικά LLNA: BrdU-ELISA (δηλαδή με συχνότητα τουλάχιστον μηνιαία) και διαθέτουν εδραιωμένη ιστορική βάση δεδομένων για τον θετικό μάρτυρα, η οποία καταδεικνύει την ικανότητα του εργαστηρίου να επιτυγχάνει αναπαραγώγιμα και ορθά αποτελέσματα με τους θετικούς μάρτυρες. Η επαρκής τεχνική ικανότητα ως προς την LLNA: BrdU-ELISA μπορεί να αποδειχθεί με την επίτευξη σταθερών θετικών αποτελεσμάτων με τον θετικό μάρτυρα σε 10 τουλάχιστον ανεξάρτητες δοκιμές που έχουν διεξαχθεί εντός εύλογου χρονικού διαστήματος, δηλαδή μικρότερου από ένα έτος.
13. Πρέπει να συμπεριλαμβάνεται πάντοτε παράλληλη ομάδα θετικού μάρτυρα όταν επέρχονται διαδικαστικές αλλαγές στην LLNA: BrdU-ELISA (π.χ. αλλαγή ειδικευμένου προσωπικού, αλλαγή υλικών και/ή αντιδραστηρίων της μεθόδου δοκιμών ή του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται σε αυτή, αλλαγή της προέλευσης των πειραματόζωων), οι οποίες πρέπει να τεκμηριώνονται στις εκθέσεις του εργαστηρίου. Πρέπει να εξετάζονται οι επιπτώσεις των αλλαγών αυτών στην επάρκεια της ήδη συγκροτημένης ιστορικής βάσης δεδομένων, προκειμένου να κριθεί αν είναι απαραίτητη η δημιουργία νέας ιστορικής βάσης δεδομένων για την τεκμηρίωση της σταθερότητας των αποτελεσμάτων που προκύπτουν με τους θετικούς μάρτυρες.

14. Οι ερευνητές θα πρέπει να γνωρίζουν ότι η απόφαση για διεξαγωγή περιοδικής και όχι ταυτόχρονης μελέτης με θετικό μάρτυρα επηρεάζει έμμεσα την επάρκεια και τη δυνατότητα αποδοχής των αρνητικών αποτελεσμάτων που προκύπτουν χωρίς παράλληλο θετικό μάρτυρα κατά το μεσοδιάστημα μεταξύ των περιοδικών μελετών με θετικό μάρτυρα. Για παράδειγμα, σε περίπτωση ψευδαρνητικού αποτελέσματος της περιοδικής μελέτης με θετικό μάρτυρα, μπορεί να αμφισβητηθούν τα αρνητικά αποτελέσματα που προέκυψαν για την ελεγχόμενη ουσία κατά το μεσοδιάστημα μεταξύ της τελευταίας αποδεκτής περιοδικής μελέτης με θετικό μάρτυρα και της μη αποδεκτής. Οι συνέπειες αυτές πρέπει να λαμβάνονται επιμελώς υπόψη όταν κρίνεται αν θα συμπεριλαμβάνονται παράλληλοι θετικοί μάρτυρες ή θα διεξάγονται απλώς περιοδικές μελέτες με θετικούς μάρτυρες. Πρέπει επίσης να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης μικρότερου αριθμού ζώων στην παράλληλη ομάδα θετικού μάρτυρα, εφόσον δικαιολογείται από επιστημονική άποψη και το εργαστήριο καταδεικνύει τη δυνατότητα χρήσης μικρότερου αριθμού ποντικών με βάση ειδικά για το ίδιο ιστορικά δεδομένα (17).
15. Παρόλο που ο θετικός μάρτυρας πρέπει να ελέγχεται στον φορέα που είναι γνωστό ότι αποσπά σταθερή απόκριση (π.χ. μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου σε αναλογία 4:1, v/v), ενδέχεται να υπάρχουν περιπτώσεις όπου οι νομοθετικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τη διεξαγωγή δοκιμών και σε μη τυποποιημένο φορέα (κλινικός/χημικός συναφές σκεύασμα) (18). Σε περίπτωση δοκιμής του παράλληλου θετικού μάρτυρα και της ελεγχόμενης ουσίας σε διαφορετικούς φορείς, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται χωριστός μάρτυρας VC για τον παράλληλο θετικό μάρτυρα.
16. Όταν αξιολογούνται ελεγχόμενες ουσίες που ανήκουν σε συγκεκριμένη τάξη χημικών ουσιών ή προκαλούν συγκεκριμένο φάσμα αποκρίσεων, είναι ενδεχομένως χρήσιμες και οι ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης για να καταδειχθεί η ορθή λειτουργία της μεθόδου ως προς την ανίχνευση του δερματικού ευαίσθητοποιητικού δυναμικού των συγκεκριμένων ειδών ελεγχόμενων ουσιών. Οι κατάλληλες ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης πρέπει να διαθέτουν τις ακόλουθες ιδιότητες:
- δομική και λειτουργική αναλογία προς την τάξη της ελεγχόμενης ουσίας,
 - γνωστά φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά,
 - δεδομένα τεκμηρίωσης που προέρχονται από την LLNA: BrdU-ELISA,
 - δεδομένα τεκμηρίωσης που αφορούν άλλα ζωικά μοντέλα και/ή τον άνθρωπο.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

Αριθμός ζώων και επίπεδα δόσεων

17. Χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τέσσερα ζώα ανά δοσολογική ομάδα, με τρεις τουλάχιστον συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας, συν μια παράλληλη ομάδα αρνητικού μάρτυρα, που υποβάλλεται σε αγωγή μόνο με τον φορέα της ελεγχόμενης ουσίας, και μια ομάδα θετικού μάρτυρα (παράλληλου ή πρόσφατου, ανάλογα με την πολιτική που εφαρμόζει το εργαστήριο λαμβάνοντας υπόψη τις παραγράφους 11-15). Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο δοκιμής με πολλαπλές δόσεις της ουσίας που χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας, κυρίως στις περιπτώσεις διαλειπουσών δοκιμών με θετικό μάρτυρα. Η μεταχείριση και η αγωγή των ζώων των ομάδων-μαρτύρων, εκτός του ότι αυτά δεν υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία, πρέπει κατά τα άλλα να είναι πανομοιότυπες με των ζώων των ομάδων αγωγής.
18. Η επιλογή των δόσεων και του φορέα πρέπει να βασίζεται στις συστάσεις των βιβλιογραφικών πηγών (2) και (19). Επιλέγονται κατά κανόνα διαδοχικές δόσεις από κατάλληλη σειρά συγκεντρώσεων, όπως 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % κ.λπ. Η επιλογή της χρησιμοποιούμενης σειράς συγκεντρώσεων πρέπει να συνοδεύεται από επαρκή επιστημονική αιτιολόγηση. Κατά την επιλογή των τριών διαδοχικών συγκεντρώσεων, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλα τα υπάρχοντα τοξικολογικά στοιχεία (π.χ. οξεία τοξικότητα και δερματικός ερεθισμός) και στοιχεία για τη δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας (και/ή ουσιών ανάλογης δομής) που ενδιαφέρουν, έτσι ώστε η υψηλότερη συγκέντρωση να μεγιστοποιεί την έκθεση, χωρίς να προκαλεί συστηματική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος (19) (20) και κεφάλαιο Β.4 του παρόντος παραρτήματος). Εάν δεν υπάρχουν τέτοια στοιχεία, μπορεί να χρειάζεται δοκιμή προδιαλογής (βλέπε παραγράφους 21-24).
19. Ο φορέας πρέπει να μην προκαλεί συστηματικά και άλλα σφάλματα στα αποτελέσματα των δοκιμών και να επιλέγεται με γνώμονα τη μεγιστοποίηση της διαλυτότητας, ώστε να προκύπτει η μέγιστη εφικτή συγκέντρωση και, ταυτόχρονα, να σχηματίζεται κατάλληλο διάλυμα/εναιώρημα για την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας. Συνιστώνται οι ακόλουθοι φορείς: μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου (4:1, v/v), N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο, μεθυλαιθυλκετόνη, προπυλενογλυκόλη και διμεθυλοσουλφοξείδιο (6), χωρίς να αποκλείεται η χρήση άλλων, εφόσον παρέχεται επαρκής επιστημονική αιτιολόγηση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να απαιτείται η χρήση, ως πρόσθετου μάρτυρα, ενός κλινικός συναφούς διαλύτη ή του σκευάσματος του εμπορίου με τη μορφή του οποίου διατίθεται στην αγορά η ελεγχόμενη ουσία. Θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη μέριμνα για την ενσωμάτωση των υδρόφιλων ελεγχόμενων ουσιών σε ένα σύστημα φορέα το οποίο διαβρέχει το δέρμα και δεν απορρέει αμέσως, με την προσθήκη κατάλληλων διαλυτοποιητών (π.χ. 1 % Pluronic® L92). Κατά συνέπεια, θα πρέπει να αποφεύγονται οι εξ ολοκλήρου υδατικοί φορείς.
20. Η επεξεργασία λεμφαδένων μεμονωμένων ποντικών επιτρέπει την εκτίμηση της μεταβλητότητας μεταξύ των ζώων και τη στατιστική ανάλυση της διαφοράς μεταξύ των μετρήσεων της ελεγχόμενης ουσίας και των μετρήσεων της ομάδας VC (βλέπε παράγραφο 33). Επιπλέον, η αξιολόγηση της δυνατότητας μείωσης του αριθμού ποντικών της ομάδας θετικού μάρτυρα είναι εφικτή μόνο εφόσον συλλέγονται δεδομένα για μεμονωμένα ζώα (17). Επίσης, ορισμένες ρυθμιστικές Αρχές απαιτούν τη συλλογή δεδομένων για μεμονωμένα ζώα. Η τακτική συλλογή δεδομένων για μεμονωμένα ζώα προσφέρει ένα πλεονέκτημα από πλευράς καλής μεταχείρισης των ζώων, καθώς αποτρέπει την επανάληψη δοκιμών που θα ήταν αναγκαία σε περίπτωση μεταγενέστερης εξέτασης των αποτελεσμάτων τα οποία έχουν προκύψει για την ελεγχόμενη ουσία με έναν τρόπο (π.χ. από συγχωνευμένα δεδομένα για τα ζώα) από ρυθμιστικές αρχές που έχουν άλλες απαιτήσεις (π.χ. δεδομένα για μεμονωμένα ζώα).

Δοκιμή προδιαλογής

21. Όταν δεν υπάρχουν στοιχεία για τον προσδιορισμό της μέγιστης δόσης προς δοκιμή (βλέπε παράγραφο 18), θα πρέπει να εκτελείται δοκιμή προδιαλογής, προκειμένου να καθοριστεί το κατάλληλο επίπεδο δόσης για τη δοκιμή με LLNA: BrdU-ELISA. Η δοκιμή προδιαλογής αποσκοπεί στην καθοδήγηση κατά την επιλογή του ανώτατου επιπέδου δόσης το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την κυρίως μελέτη LLNA: BrdU-ELISA, στις περιπτώσεις που δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με τη συγκέντρωση η οποία επάγει συστηματική τοξικότητα (βλέπε παράγραφο 24) και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος (βλέπε παράγραφο 23). Το ανώτατο επίπεδο δόσης που χρησιμοποιείται στη δοκιμή πρέπει να είναι η συγκέντρωση 100 % της ελεγχόμενης ουσίας, εάν αυτή είναι υγρή, ή η μέγιστη δυνατή συγκέντρωση, προκειμένου για στερεά ή εναιωρήματα.
22. Η δοκιμή προδιαλογής διεξάγεται στις ίδιες συνθήκες όπως η κυρίως μελέτη LLNA: BrdU-ELISA, εκτός από την εκτίμηση του πολλαπλασιασμού στους λεμφαδένες, η οποία παραλείπεται, και τη δυνατότητα μείωσης του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται σε κάθε δοσολογική ομάδα. Προτείνεται η χρήση ενός ή δύο ζώων ανά δοσολογική ομάδα. Όλοι οι ποντικοί εξετάζονται καθημερινά για την ανίχνευση κλινικών σημείων συστηματικής τοξικότητας ή τοπικού ερεθισμού στο σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας. Καταγράφεται το βάρος σώματος πριν από την έναρξη και πριν από τον τερατισμό της δοκιμής (6η ημέρα). Εξετάζονται και τα δύο αυτιά κάθε ποντικού για την ανίχνευση ερυθρήματος, το οποίο βαθμολογείται με τη βοήθεια του πίνακα 1 (20 και κεφάλαιο B.4 του παρόντος παραρτήματος). Μετράται το πάχος των αυτιών με παχύμετρο (π.χ. ψηφιακό μικρόμετρο ή παχύμετρο Peacock Dial) την 1η ημέρα (πριν από τη χορήγηση της δόσης), την 3η ημέρα (περίπου 48 ώρες μετά την πρώτη δόση) και την 6η ημέρα. Επιπλέον, το πάχος των αυτιών είναι δυνατόν να προσδιοριστεί την 6η ημέρα με προσδιορισμούς βάρους δείγματος αυτιού λαμβανόμενου με λαβίδα βιοψίας, οι οποίοι πρέπει να εκτελούνται μετά τη θανάτωση των ζώων με ευθανασία. Μια βαθμολογία ερυθρήματος ≥ 3 και/ή η αύξηση του πάχους των αυτιών κατά $\geq 25\%$, σε οποιαδήποτε ημέρα μέτρησης, αποτελούν ενδείξεις υπέρμετρου τοπικού ερεθισμού (21) (22). Ως μέγιστη δόση για την κυρίως μελέτη LLNA: BrdU-ELISA επιλέγεται η αμέσως χαμηλότερη δόση στη σειρά συγκεντρώσεων της προδιαλογής (βλέπε παράγραφο 18) η οποία δεν επάγει συστηματική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος.

Πίνακας 1

Βαθμολογία ερυθρήματος

Παρατήρηση	Βαθμολογία
Απουσία ερυθρήματος	0
Πολύ ελαφρό ερύθημα (μόλις αντιληπτό)	1
Περιγεγραμμένο ερύθημα	2
Μέτριο έως σοβαρό ερύθημα	3
Σοβαρό ερύθημα (ερυθρότητα τεύτλων) έως σχηματισμός εσχάρων που εμποδίζει τη διαβάθμιση του ερυθρήματος	4

23. Εκτός από την αύξηση του πάχους των αυτιών κατά 25 % (21) (22), έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση των ερεθιστικών ουσιών κατά την LLNA η στατιστικά σημαντική αύξηση του πάχους των αυτιών των ποντικών που υποβάλλονται σε αγωγή σε σύγκριση με τους ποντικούς-μάρτυρες (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Ωστόσο, η αύξηση του πάχους των αυτιών κατά λιγότερο από 25 %, έστω και αν είναι στατιστικά σημαντική, δεν έχει συσχετιστεί ειδικά με υπέρμετρο ερεθισμό (25) (26) (27) (28) (29).
24. Οι ακόλουθες κλινικές παρατηρήσεις, εντασσόμενες σε ολοκληρωμένη εκτίμηση, είναι δυνατόν να αποτελούν ένδειξη συστηματικής τοξικότητας (30) και, κατ'έκταση, να υποδεικνύουν το ανώτατο επίπεδο δόσης προς χρήση στην κυρίως μελέτη LLNA: BrdU-ELISA αλλαγές στη λειτουργία του νευρικού συστήματος (π.χ. ανόρθωση τριχών, αταξία, τρόμοι, σπασμοί), στη συμπεριφορά (π.χ. επιθετικότητα, αλλαγή όσον αφορά την περιποίηση του σώματος, έντονη μεταβολή της κινητικότητας), στον αναπνευστικό ρυθμό (δηλαδή μεταβολές της συχνότητας και της έντασης των αναπνοών, όπως δύσπνοια, ασθμαίνουσα αναπνοή και ρόγχος), καθώς και στην κατανάλωση τροφής και νερού. Επιπλέον, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στην αξιολόγηση τα σημεία λήθαργου και/ή απουσίας αντίδρασης σε ερεθίσματα και κάθε κλινικό σημείο που υπερβαίνει τον ελαφρό ή στιγμιαίο πόνο και δυσφορία, η μείωση του βάρους σώματος κατά $> 5\%$ μεταξύ 1ης και 6ης ημέρας και η θνησιμότητα. Τα ετοιμοθάνατα ζώα, καθώς και όσα παρουσιάζουν σημεία έντονου πόνου και δυσφορίας, πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία (31).

Πρόγραμμα πειραμάτων της κυρίως μελέτης

25. Το πρόγραμμα πειραμάτων της δοκιμασίας έχει ως εξής:

- 1η ημέρα: Κάθε ζώο ζυγίζεται χωριστά και καταγράφονται το βάρος του και οι ενδεχόμενες κλινικές παρατηρήσεις. Στη ραχιαία επιφάνεια κάθε αυτιού τοποθετούνται 25 μL κατάλληλης αραιώσης της ελεγχόμενης ουσίας, του φορέα μόνου ή του θετικού μάρτυρα (παράλληλου ή πρόσφατου, ανάλογα με την πολιτική που εφαρμόζει το εργαστήριο λαμβάνοντας υπόψη τις παραγράφους 11-15).
- 2η και 3η ημέρα: Επαναλαμβάνεται η διαδικασία εφαρμογής της ουσίας όπως την πρώτη ημέρα.
- 4η ημέρα: Καμία αγωγή.
- 5η ημέρα: Χορηγούνται ενδοπεριτοναϊκώς 0,5 mL (5 mg/ποντικό) διαλύματος BrdU (10 mg/mL).

- 6η ημέρα: Καταγράφονται το βάρος κάθε ζώου και οι ενδεχόμενες κλινικές παρατηρήσεις. Περίπου 24 ώρες μετά τη χορήγηση της BrdU, τα ζώα θανατώνονται με ευθανασία. Εκτέμνονται οι αποχετευτικοί ωτικοί λεμφαδένες από κάθε αυτί ποντικού και υποβάλλονται χωριστά σε επεξεργασία με φυσιολογικό ορό στον οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS) ανά ζώο. Λεπτομέρειες και διαγράμματα για την αναγνώριση και την εκτομή των λεμφαδένων παρέχονται στη βιβλιογραφική πηγή (17). Για την περαιτέρω παρακολούθηση της τοπικής απόκρισης του δέρματος κατά την κυρίως μελέτη, το πρωτόκολλό της μπορεί να περιλαμβάνει πρόσθετες παραμέτρους, όπως βαθμολογία του ωτικού ερυθήματος ή μετρήσεις του πάχους των αυτιών (με τη βοήθεια παχυμέτρου ή με προσδιορισμούς βάρους δείγματος αυτιού λαμβανόμενου με λαβίδα βιοψίας κατά τη νεκροψία).

Παρασκευή κυτταρικών εναιωρημάτων

26. Παρασκευάζεται εναιώρημα μεμονωμένων λεμφοκυττάρων από τους λεμφαδένες που έχουν ληφθεί με αμφοτερόπλευρη εκτομή από κάθε ποντικό, με ήπια μηχανική διάσπαση μέσω πλέγματος από ανοξείδωτο χάλυβα με σπές των 200 μm ή με άλλη αποδεκτή τεχνική σχηματισμού εναιωρήματος μεμονωμένων κυττάρων (π.χ. σύνθλιψη των λεμφαδένων με τη βοήθεια πλαστικού υπέρυθρου (γουδοχέρι) μιας χρήσης, ακολουθούμενη από διήθηση μέσω δικτυωτού πλέγματος από νάιλον των 70 μm). Δεδομένου ότι η διαδικασία παρασκευής του εναιωρήματος λεμφοκυττάρων είναι κρίσιμης σημασίας για την παρούσα δοκιμασία, κάθε χειριστής θα πρέπει να έχει αποκτήσει εκ των προτέρων τη σχετική δεξιότητα. Εξάλλου, επειδή οι λεμφαδένες των ζώων της ομάδας αρνητικού μάρτυρα είναι μικροί, είναι σημαντικό να εκτελείται η εργασία αυτή με προσοχή ώστε να αποφεύγονται οι τεχνητές επιδράσεις στις τιμές του SI. Σε κάθε περίπτωση, ο στοχευόμενος όγκος του εναιωρήματος λεμφοκυττάρων πρέπει να ρυθμίζεται σε βελτιστοποιημένο όγκο (περίπου 15 mL), ο οποίος προσδιορίζεται με γνώμονα την επίτευξη μέσης τιμής απορρόφησης 0,1-0,2 στην ομάδα αρνητικού μάρτυρα.

Προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (μέτρηση της περιεκτικότητας του DNA των λεμφοκυττάρων σε BrdU)

27. Η περιεκτικότητα σε BrdU μετράται με την τεχνική ELISA, με τη χρήση ενός συνόλου αντιδραστηρίων του εμπορίου (π.χ. Roche Applied Science, Mannheim, Γερμανία, αριθ. καταλόγου 11 647 229 001). Περιληπτικά, φέρονται 100 μL εναιωρήματος λεμφοκυττάρων, εις τριπλούν, στις κοιλότητες (μικροκυψελίδες) πλάκας μικροτιτλοδότησης με επίπεδο πυθμένα. Μετά από μονιμοποίηση και αποδιάταξη των λεμφοκυττάρων, προστίθεται σε κάθε κοιλότητα αντίσωμα anti-BrdU και αφήνεται να αντιδράσει. Στη συνέχεια απομακρύνεται το αντίσωμα anti-BrdU με έκπλυση και προστίθεται το διάλυμα υποστρώματος για να παραχθεί το χρωμογόνο. Μετράται έπειτα η απορρόφηση στα 370 nm, με μήκος κύματος αναφοράς τα 492 nm. Σε όλες τις περιπτώσεις πρέπει να βελτιστοποιούνται οι συνθήκες δοκιμής (βλέπε παράγραφο 26).

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Κλινικές παρατηρήσεις

28. Κάθε ποντικός πρέπει να εξετάζεται με προσοχή, τουλάχιστον μία φορά ημερησίως, για την ανίχνευση κλινικών σημείων είτε τοπικού ερεθισμού στο σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας είτε συστημικής τοξικότητας. Όλες οι παρατηρήσεις καταγράφονται συστηματικά σε χωριστό αρχείο για κάθε ποντικό. Τα σχέδια παρακολούθησης πρέπει να περιλαμβάνουν κριτήρια για τον ταχύ εντοπισμό, με σκοπό την ευθανασία, των ποντικών που εμφανίζουν συστημική τοξικότητα ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό ή διάβρωση του δέρματος (31).

Βάρος σώματος

29. Όπως αναφέρεται στην παράγραφο 25, το βάρος κάθε ζώου πρέπει να μετράται κατά την έναρξη της δοκιμής και κατά τον προγραμματισμένο χρόνο ευθανασίας.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

30. Τα αποτελέσματα για κάθε ομάδα αγωγής εκφράζονται σε μέση τιμή SI. Ο SI προκύπτει με διαίρεση της μέσης τιμής του δείκτη σήμανσης BrdU/ποντικό κάθε ομάδας αγωγής με την ελεγχόμενη ουσία, όπως επίσης και της ομάδας θετικού μάρτυρα, διά της μέσης τιμής του δείκτη σήμανσης BrdU/ποντικό της ομάδας που υποβλήθηκε σε αγωγή με τον διαλύτη/ομάδας VC. Στην περίπτωση αυτή, ο μέσος SI για τις ομάδες VC ισούται με τη μονάδα.

Ο δείκτης σήμανσης BrdU ορίζεται ως εξής:

$$\text{Δείκτης σήμανσης BrdU} = (\text{ABS}_{\text{em}} - \text{ABS}_{\text{τυφλού}_{\text{em}}}) - (\text{ABS}_{\text{ref}} - \text{ABS}_{\text{τυφλού}_{\text{ref}}})$$

όπου: em = μήκος κύματος εκπομπής και ref = μήκος κύματος αναφοράς.

31. Στη διαδικασία λήψης απόφασης, ένα αποτέλεσμα θεωρείται θετικό όταν SI $\geq 1,6$ (10). Ωστόσο, όταν κρίνεται αν ένα οριακό αποτέλεσμα (δηλαδή τιμή SI από 1,6 έως 1,9) θα χαρακτηριστεί ή όχι θετικό, μπορούν επίσης να χρησιμοποιούνται η ισχύς της σχέσης δόσης-απόκρισης, η στατιστική σημαντικότητα και η σταθερότητα των αποκρίσεων των μαρτύρων που υποβάλλονται σε αγωγή με τον διαλύτη/φορέα και των θετικών μαρτύρων (3) (6) (32).

32. Προκειμένου να επιβεβαιώσουν οι χρήστες ότι μια οριακή θετική απόκριση με SI από 1,6 έως 1,9 αποτελεί θετικό αποτέλεσμα, μπορεί να επιθυμούν να λάβουν υπόψη τις τιμές του SI σε συνδυασμό με συμπληρωματικές πληροφορίες, όπως η σχέση δόσης-απόκρισης, τα στοιχεία συστημικής τοξικότητας ή υπέρμετρου ερεθισμού και, εφόσον ενδεικνύεται, η στατιστική σημαντικότητα (10). Θα πρέπει επίσης να συνεκτιμώνται διάφορες ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας, μεταξύ των οποίων το κατά πόσον έχει δομική σχέση με γνωστές ευαισθητοποιητικές για το δέρμα ουσίες, το κατά πόσον προκαλεί υπέρμετρο ερεθισμό του δέρματος του ποντικού και το είδος της σχέσης δόσης-απόκρισης που παρατηρήθηκε. Αυτά και άλλα κριτήρια αναλύονται στη βιβλιογραφική πηγή (4).

33. Η συλλογή δεδομένων σε επίπεδο μεμονωμένου ποντικού καθιστά δυνατή τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων για τη διαπίστωση της ύπαρξης σχέσης δόσης-απόκρισης και του βαθμού της σχέσης αυτής. Η ενδεχόμενη στατιστική εκτίμηση θα μπορούσε να περιλαμβάνει αξιολόγηση της σχέσης δόσης-απόκρισης, καθώς και κατάλληλα προσαρμοσμένες συγκρίσεις των ομάδων δοκιμής (π.χ. συγκρίσεις κατά ζεύγη μεταξύ της ομάδας που λαμβάνει τη δόση και της παράλληλης ομάδας-μάρτυρα που λαμβάνει τον διαλύτη/φορέα). Οι στατιστικές αναλύσεις είναι δυνατόν να περιλαμβάνουν, λόγω χάριν, γραμμική παλινδρόμηση ή δοκιμή William για την εκτίμηση των τάσεων της απόκρισης σε σχέση με τη δόση και δοκιμή Dunnett για τις συγκρίσεις κατά ζεύγη. Κατά την επιλογή της ενδεδειγμένης μεθόδου στατιστικής ανάλυσης, ο ερευνητής θα πρέπει να έχει επίγνωση των πιθανών άνοιων διακυμάνσεων (διασπορών) και άλλων συναφών προβλημάτων τα οποία ενδέχεται να επιβάλλουν μετασχηματισμό των δεδομένων ή μη παραμετρική στατιστική ανάλυση. Σε κάθε περίπτωση, ενδέχεται να χρειαστεί να εκτελέσει ο ερευνητής υπολογισμούς του SI και στατιστικές αναλύσεις με και χωρίς ορισμένα σημεία δεδομένων (καλούμενα μερικές φορές "έκτροπες τιμές").

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ

Δεδομένα

34. Τα δεδομένα πρέπει να συγκεφαλαιώνονται με τη μορφή πίνακα, στον οποίο εμφανίζονται η τιμή του δείκτη σήμανσης BrdU για κάθε ζώο, ο ομαδικός μέσος δείκτης σήμανσης BrdU/ζώο, η σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM) και η μέση τιμή του SI για κάθε δοσολογική ομάδα σε σύγκριση με την παράλληλη ομάδα-μάρτυρα που υποβλήθηκε σε αγωγή με τον διαλύτη/φορέα.

Έκθεση δοκιμής

35. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιέχει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη χημική ουσία και μάρτυρες:

- στοιχεία ταυτότητας (π.χ. αριθ. CAS και EC, εφόσον υπάρχουν, πηγή, καθαρότητα, γνωστές προσιμίες, αριθμός παρτίδας),
- σύσταση και φυσικές και χημικές ιδιότητες (π.χ. πτητικότητα, σταθερότητα, διαλυτότητα),
- προκειμένου για μείγματα, σύνθεση και εκατοστιαία αναλογία των συστατικών.

Διαλύτης/φορέας:

- στοιχεία ταυτότητας (καθαρότητα, συγκέντρωση, κατά περίπτωση, όγκος που χρησιμοποιήθηκε),
- αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα.

Ζώα της δοκιμής:

- προέλευση των ποντικών της φυλής CBA,
- μικροβιολογική κατάσταση των ζώων, εφόσον είναι γνωστή,
- αριθμός και ηλικία των ζώων,
- προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.

Συνθήκες δοκιμής:

- προέλευση, αριθμός παρτίδας και δεδομένα του κατασκευαστή για τον ποιοτικό έλεγχο/διασφάλιση ποιότητας (ευαισθησία και εξειδίκευση του αντισώματος και όριο ανίχνευσης) του συνόλου αντιδραστηρίων (kit) για ELISA,
- λεπτομέρειες για την παρασκευή και εφαρμογή του δείγματος της ελεγχόμενης ουσίας,
- αιτιολόγηση της επιλογής των δόσεων (συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων της δοκιμής προδιαλογής, εφόσον έχει διεξαχθεί),
- συγκεντρώσεις φορέα και ελεγχόμενης ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν και συνολική ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας που χορηγήθηκε,
- λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού (μεταξύ άλλων, τύπος/προέλευση του σιτηρεσίου, προέλευση του νερού),
- λεπτομέρειες για τα προγράμματα αγωγής και δειγματοληψίας,
- μέθοδοι μέτρησης της τοξικότητας,

- κριτήρια χαρακτηρισμού της μελέτης ως θετικής ή αρνητικής,
- λεπτομέρειες για τυχόν παρεκκλίσεις από το πρωτόκολλο και επεξήγηση του τρόπου με τον οποίο αυτές επηρεάζουν τον σχεδιασμό και τα αποτελέσματα της μελέτης.

Έλεγχος αξιοπιστίας:

- περίληψη των αποτελεσμάτων του πιο πρόσφατου ελέγχου αξιοπιστίας, συμπεριλαμβανομένων πληροφοριών σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, τη συγκέντρωση και τον φορέα που χρησιμοποιήθηκε,
- δεδομένα του εργαστηρίου δοκιμών που αφορούν τον παράλληλο και/ή ιστορικό θετικό μάρτυρα και τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα (αγωγή με τον διαλύτη/φορέα),
- εάν δεν συμπεριελήφθη στη δοκιμή παράλληλος θετικός μάρτυρας, ημερομηνία διεξαγωγής της πιο πρόσφατης περιοδικής δοκιμής με θετικό μάρτυρα και σχετική έκθεση του εργαστηρίου, καθώς και έκθεση με λεπτομερή ιστορικά δεδομένα του εργαστηρίου για τον θετικό μάρτυρα που δικαιολογούν την απόφαση να μη συμπεριληφθεί παράλληλος θετικός μάρτυρας.

Αποτελέσματα:

- βάρος κάθε ποντικού κατά την έναρξη της χορήγησης των δόσεων και κατά τον προγραμματισμένο χρόνο ευθανασίας· καθώς και μέση τιμή και σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM) για κάθε ομάδα αγωγής,
- για κάθε ζώο, χρόνος εκδήλωσης και εξέλιξη των σημείων τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένου τυχόν ερεθισμού του δέρματος στο σημείο χορήγησης,
- πίνακας με τις τιμές του δείκτη σήμανσης BrdU ανά ποντικό και τις τιμές SI για κάθε δοσολογική ομάδα αγωγής,
- για κάθε ομάδα αγωγής, μέση τιμή του δείκτη σήμανσης BrdU/ποντικό και σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM), καθώς και τα αποτελέσματα της ανάλυσης έκτροπων τιμών,
- υπολογισμένος SI και κατάλληλο μέτρο μεταβλητότητας στο οποίο συνεκτιμάται η μεταβλητότητα μεταξύ των ζώων, τόσο της ομάδας που υποβάλλεται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία όσο και των ομάδων-μαρτύρων,
- σχέση δόσης-απόκρισης,
- στατιστικές αναλύσεις, κατά περίπτωση.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων:

- σύντομος σχολιασμός των αποτελεσμάτων, της ανάλυσης της σχέσης δόσης-απόκρισης και, κατά περίπτωση, των στατιστικών αναλύσεων, με γνωμάτευση για τον χαρακτηρισμό ή μη της ελεγχόμενης ουσίας ως ευαισθητοποιητικής για το δέρμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

- (6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Διατίθεται στον ιστότοπο: [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. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<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. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPrept2009.pdf]
- (12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.*, 25, 129-134.
- (13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreesen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- (15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- (16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]
- (18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- (22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fdLLNA/BRDcomplete.pdf>].

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

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: η εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί μέτρο των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την “συνφωνία” για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (33).

Ουσία συγκριτικής αξιολόγησης: ουσία, ευαίσθητοποιητική ή μη, που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για σύγκριση με ελεγχόμενη ουσία. Μια ουσία συγκριτικής αξιολόγησης πρέπει να διαθέτει τις ακόλουθες ιδιότητες: i) σταθερή(-ές) και αξιόπιστη(-ες) προέλευση(-εις), ii) δομική και λειτουργική αναλογία προς την τάξη των ελεγχόμενων ουσιών, iii) γνωστά φυσικά/χημικά χαρακτηριστικά, iv) δεδομένα τεκμηρίωσης γνωστών επιδράσεων και v) γνωστή ισχύ στο εύρος της επιθυμητής απόκρισης.

Ψευδαρνητικό αποτέλεσμα: ο εσφαλμένος χαρακτηρισμός ελεγχόμενης ουσίας ως αρνητικής ή μη δραστηκής με μέθοδο δοκιμών, ενώ στην πραγματικότητα είναι θετική ή δραστηκή (33).

Ψευδοθετικό αποτέλεσμα: ο εσφαλμένος χαρακτηρισμός ελεγχόμενης ουσίας ως θετικής ή δραστηκής με δοκιμή, ενώ στην πραγματικότητα είναι αρνητική ή μη δραστηκή (33).

Κίνδυνος: το δυναμικό δυσμενούς επίδρασης στην υγεία ή στο περιβάλλον. Η δυσμενής επίδραση εκδηλώνεται μόνο εάν τα επίπεδα έκθεσης είναι επαρκή.

Διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: μέτρο του βαθμού στον οποίο διαφορετικά ειδικευμένα εργαστήρια μπορούν να επιτυγχάνουν ποιοτικά και ποσοτικά παραπλήσια αποτελέσματα, χρησιμοποιώντας το ίδιο πρωτόκολλο και υποβάλλοντας σε δοκιμή την ίδια ελεγχόμενη ουσία. Η διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα προσδιορίζεται κατά τις διαδικασίες προεπικύρωσης και επικύρωσης και αποτελεί ένδειξη του κατά πόσον υπάρχει δυνατότητα επιτυχούς μεταφοράς μιας δοκιμής μεταξύ εργαστηρίων· καλείται επίσης “αναπαραγωγιμότητα μεταξύ εργαστηρίων” (33).

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: προσδιορισμός του βαθμού στον οποίο ειδικευμένα άτομα μπορούν να επαναλάβουν με επιτυχία τα ίδια αποτελέσματα εντός του ίδιου εργαστηρίου, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο πρωτόκολλο σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Καλείται επίσης “αναπαραγωγιμότητα εντός του εργαστηρίου” (33).

Έκτροπη τιμή: έκτροπη τιμή (outlier) είναι μια παρατήρηση σε τυχαίο δείγμα πληθυσμού η οποία διαφέρει σημαντικά από άλλες τιμές αυτού του δείγματος.

Διασφάλιση ποιότητας: διαχειριστική διαδικασία με την οποία αξιολογούνται, από άτομα ανεξάρτητα από εκείνα που εκτελούν τις δοκιμές, η τήρηση των προτύπων, των απαιτήσεων και των διαδικασιών τήρησης αρχείων που αφορούν τις εργαστηριακές δοκιμές, καθώς και η ορθότητα της μεταφοράς δεδομένων.

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (33).

Δερματική ευαισθητοποίηση: ανοσολογική διαδικασία που είναι αποτέλεσμα της τοπικής έκθεσης ευπαθούς ατόμου σε επαγωγικό χημικό αλλεργιογόνο, το οποίο προκαλεί δερματική ανοσοαπόκριση που μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ευαισθητοποίησης εξ επαφής.

Δείκτης διέγερσης (SI): αριθμητική τιμή η οποία υπολογίζεται προκειμένου να εκτιμηθεί το δερματικό ευαισθητοποιητικό δυναμικό μιας ελεγχόμενης ουσίας και ισούται με την αναλογία του πολλαπλασιασμού στις ομάδες που υποβάλλονται σε αγωγή με την ουσία προς τον πολλαπλασιασμό στην ομάδα που υποβάλλεται ταυτόχρονα σε αγωγή με τον φορέα.

Ελεγχόμενη ουσία (καλούμενη επίσης “ελεγχόμενη χημική ουσία”): κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.»
