

Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 640/2012**2013/EES/46/07**

frá 6. júlí 2012

um breytingu á reglugerð (EB) nr. 440/2008 þar sem mælt er fyrir um prófunaraðferðir samkvæmt reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1907/2006 um skráningu, mat, leyfisveitingu og takmarkanir, að því er varðar efni, í því skyni að laga hana að tækniframförum (efnareglurnar (REACH)) (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS
HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

staðgönguáðferðum sem Efnahags- og framfarastofnunin hefur nýlega samþykkt til að fækka dýrum, sem eru notuð í tilraunaskyni, í samræmi við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2010/63/ESB frá 22. september 2010 um vernd dýra sem eru notuð í vísindaskyni⁽³⁾ og tilskipun ráðsins 86/609/EBE frá 24. nóvember 1986 um samræmingu á ákvæðum í lögum og stjórnsýslufyrirmælum aðildarríkjanna um verndun dýra sem notuð eru í tilrauna- og vísindaskyni⁽⁴⁾. Haft var samráð við hagsmunaaðila um þessi drög.

með hliðsjón af reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1907/2006 frá 18. desember 2006 um skráningu, mat, leyfisveitingu og takmarkanir, að því er varðar efni (efnareglurnar (REACH)), um stofnun Efnastofnunar Evrópu, um breytingu á tilskipun 1999/45/EB og um niðurfellingu á reglugerð ráðsins (EBE) nr. 793/93 og reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1488/94, sem og tilskipun ráðsins 76/769/EBE og tilskipunum framkvæmdastjórnarinnar 91/155/EBE, 93/67/EBE, 93/105/EB og 2000/21/EB⁽¹⁾, einkum 3. mgr. 13. gr.,

- 3) Því ber að breyta reglugerð (EB) nr. 440/2008 til samræmis við það.
- 4) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari reglugerð, eru í samræmi við álit nefndarinnar sem komið var á fót skv. 133. gr. reglugerðar (EB) nr. 1907/2006.

og að teknu tilliti til efiðfarandi:

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

- 1) Í reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 440/2008⁽²⁾ er að finna þær prófunaraðferðir sem skal beitt í þeim tilgangi að ákvarða eðlisefnafræðilega eiginleika, eiturhrif og vísititurhrif efna að því er varðar reglugerð (EB) nr. 1907/2006.

1. gr.

Viðaukanum við reglugerð (EB) nr. 440/2008 er breytt í samræmi við viðaukann við þessa reglugerð.

- 2) Nauðsynlegt er að uppfæra reglugerð (EB) nr. 440/2008 með megináherslu á að bæta við nýjum og uppfærðum

2. gr.

(*) Þessi EB-gerð birtist í Stjtið. ESB L 193, 20.7.2012, bls. 1. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 69/2013 frá 3. maí 2013 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn, biður birtingar.

⁽¹⁾ Stjtið. ESB L 396, 30.12.2006, bls. 1.

⁽²⁾ Stjtið. ESB L 142, 31.5.2008, bls. 1.

Reglugerð þessi öðlast gildi á þriðja degi eftir að hún birtist í *Stjórnartíðindum Evrópusambandsins*.

⁽³⁾ Stjtið. ESB L 276, 20.10.2010, bls. 33.

⁽⁴⁾ Stjtið. EB L 358, 18.12.1986, bls. 1.

Reglugerð þessi er bindandi í heild sinni og gildir í öllum aðildarríkjunum án frekari lögfestingar.

Gjört í Brussel 6. júlí 2012.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Forseti.

José MANUEL BARROSO

VIÐAUKI

Viðaukanum við reglugerð (EB) nr. 440/2008 er breytt sem hér segir:

1. Í stað kafla B.42 komi eftirfarandi:

„B.42. HÚÐNÆMING: EITLAGREINING

INNGANGUR

1. Viðmiðunarreglur Efnahags- og framfarastofnunarinnar um prófun íðefna, sem og prófunaraðferðir ESB sem byggjast á þeim reglum, eru endurskoðaðar reglulega með hliðsjón af framþróun í vísindum, þörf á nýrri löggjöf og sjónarmiðum er varða velferð dýra. Upprunalega prófunaraðferðin til að ákvarða húðnæmingu í músum, eitlagreining (e. *Local Lymph Node Assay* (LLNA)) (OECD-viðmiðunarregla 429 um prófanir, kafla B.42 í þessum viðauka), hefur þegar verið samþykkt (1. heimild). Upplýsingar um fullgildingu eitlagreiningar og yfirlit yfir það starf sem tengist henni hafa verið birt (2.–11. heimild). Uppfærða eitlagreiningin er byggð á mati á fenginni reynslu og vísindagögnum (12. heimild). Þetta er önnur prófunaraðferðin sem er hönnuð til að meta mátt íðefna (efna og blandna) til húðnæmingar hjá dýrum. Í hinni prófunaraðferðinni (OECD-viðmiðunarregla 406 um prófanir, kafla B.6 í þessum viðauka) eru notaðar prófanir á naggrísnum, einkum hámröknarprófun á naggrísnum og Buehlers-prófun (13. heimild). Eitlagreining hefur kosti fram yfir B.6 og OECD-viðmiðunarreglu 406 um prófanir (13. heimild) með tilliti til velferðar dýra. Þessi uppfærða eitlagreiningarprófunaraðferð felur í sér nothæfisstaðla (1. viðbætur) sem má nota til að meta fullgildingarstöðu nýrra og/eða breyttra prófunaraðferða, sem samsvara eitlagreiningunni með tilliti til virkni og verkunarmáta, í samræmi við meginreglurnar í leiðbeiningarskjali OECD nr. 34 (14. heimild).
2. Eitlagreiningin er notuð til að rannsaka örvunarfasa húðnæmingar og veitir meginlegar upplýsingar sem henta til að meta skammtasvörum. Það skal tekið fram að vægir eða hóflegir næmar, sem er mælt með sem jákvæðum samanburðariðefnum fyrir aðferðir til prófunar á naggrísnum (B.6 og OECD-viðmiðunarregla 406 um prófanir) (13. heimild), henta einnig vel þegar eitlagreining er notuð (6., 8. og 15. heimild). Einfaldaðri eitlagreiningu (e. *reduced LLNA*), þar sem notuð eru allt að 40% færri dýr, er einnig lýst sem valkosti í þessari prófunaraðferð. Heimilt er að nota einfölduðu eitlagreininguna ef það er lagaleg þörf á því að staðfesta neikvæða spá um húðnæmingarmátt, að því tilskildu að öllum öðrum forskriftum aðferðarlýsingar fyrir eitlagreiningu sé fylgt, eins og lýst er í þessari prófunaraðferð. Spá um neikvæðar niðurstöður skal byggjast á öllum tiltækum upplýsingum, eins og lýst er í 4. mgr. Áður en einfölduðu eitlagreiningunni er beitt skal leggja fram skýr rök og vísindalegar forsendur notkun hennar. Ef niðurstöður úr einfölduðu eitlagreiningunni eru jákvæðar eða tvíærðar, þótt búist hafi verið við öðru, getur þurft viðbótarprófanir til að fá skýra niðurstöðu eða túlka hana. Ekki skal nota einfaldaða eitlagreiningu við hættugreiningu á húðnæmandi prófunarefnum þegar þörf er á upplýsingum um skammtasvörum, s.s. við undirflokkun samkvæmt reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun efna og blandna og samkvæmt HSK SP (hnattsamræmdu kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum).

SKILGREININGAR

3. Skilgreiningar, sem eru notaðar, eru gefnar upp í 2. viðbæti.

ATRIÐI, SEM ÞARF AÐ HAFI Í HUGA Í UPPHAFI, OG TAKMARKANIR

4. Eitlagreiningin er staðgönguáferð sem er ætluð til að greina íðefni sem kunna að vera húðnæmandi. Þetta þýðir ekki endilega að alltaf skuli nota eitlagreininguna í stað prófunar á naggrísnum (þ.e. B.6 og OECD-viðmiðunarreglu 406 um prófanir) (13. heimild) heldur að greiningin sé jafngild og að hana megi nota sem staðgönguáferð í tilvikum þar sem jákvæðar eða neikvæðar niðurstöður þurfa að jafnaði ekki frekari staðfestingar við. Prófunarstofan skal skoða allar fánlegar upplýsingar um prófunarefnið áður en rannsókn hefst. Meðal slíkra upplýsinga eru auðkenni og efnafraðileg bygging prófunarefnisins, eðlisefnafraðilegir eiginleikar þess, niðurstöður úr öllum öðrum eiturhrifaprófunum á prófunarefninu í glasi og í lífi og eiturefnafraðileg gögn um efni með skylda byggingu. Þessar upplýsingar skulu skoðaðar í því skyni að ákvarða hvort eitlagreining sé viðeigandi fyrir efnið (með hliðsjón af því að ekki er unnt að nota eitlagreininguna fyrir tiltekna tegundir íðefna, sjá 5. mgr.) og til að auðvelda val á skömmtum.
5. Eitlagreiningin er aðferð til greiningar í lífi og þar af leiðandi útilokar hún ekki að dýr séu notuð við mat á næmingu fyrir snertiofnæmi. Hún gefur þó möguleika á því að fækka dýrunum sem nota þarf í þessum tilgangi. Auk þess býður eitlagreining upp á verulega framför í meðferð dýra við prófanir á næmingu fyrir snertiofnæmi (minni sársauka og þjáningu). Eitlagreiningin byggist á athugunum á ónæmisfræðilegum fyrirbærum sem eru örvuð með íðefnum í örvunarfasa næmingar. Ólíkt því sem á við um prófanir á naggrísnum (þ.e. B.6 og OECD-viðmiðunarreglu 406 um prófanir) (13. heimild) er ekki þörf á því við eitlagreiningu að kalla fram ofurnæmissvörum í húð. Ekki þarf heldur að nota glæðiefni við eitlagreiningu eins og gera þarf við hámröknarprófun á naggrísnum (13. heimild). Eitlagreining minnkar því þann sársauka og þær þjáningar sem dýrin þurfa að þola. Þrátt fyrir þá kosti, sem eitlagreining hefur fram yfir B.6 og OECD-viðmiðunarreglu 406 um prófanir, skal þó viðurkennt að hún hefur vissar takmarkanir sem geta gert það nauðsynlegt að nota B.6 eða OECD-viðmiðunarreglu 406 um prófanir (13. heimild) (t.d. vegna falsneikvæðra niðurstaðna úr eitlagreiningu með tilteknum málum, falsjákvæðra niðurstaðna með tilteknum húðertingarefnum, s.s. sumum yfirborðsvirkum íðefnum, (19. og 20. heimild), eða leysni prófunarefnisins). Auk

Þess getur verið nauðsynlegt að nota prófanir á naggrísnum (B.6, OECD-viðmiðunaregla 406 um prófanir) þegar um er að ræða íðefnaflokkka eða efni sem innihalda virka hópa sem sýnt hefur verið fram á að geti verið truflandi þættir (e. *confounders*) (13. heimild). Vegna hins takmarkaða fullgildingargagnagrunns, sem samanstóð fyrst og fremst af varnarefnablöndum, er jákvæð niðurstaða fyrir þessar gerðir prófunarefna auk þess líklegri með eitlagreiningunni en prófuninni á naggrísnum. Við prófun á samsetningum skal þó tekið til athugunar að nota einnig samsvarandi efni með þekktum niðurstöðum sem viðmiðunarefni til að sýna fram á að eitlagreiningin virki rétt (sjá 16. mgr.) Fyrir utan þessar þekktu takmarkanir á að vera hægt að nota eitlagreininguna til að prófa öll efni nema þau hafi eiginleika sem gætu haft áhrif á nákvæmni eitlagreiningarinnar.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

- Eitlagreiningin byggist á þeirri grundvallarreglu að næmar valdi fjölgun eitilfrumna í dreineitlunum við staðinn þar sem prófunarefnið var borið á. Þessi fjölgun er í réttu hlutfalli við skammtinn og mátt ofnæmisvaldsins sem er borinn á og er einföld leið til að fá meginlega mælingu á næmingunni. Fjölgunin er mæld með því að bera saman meðalfjölgun í hverjum prófunarhópi og meðalfjölgun í samanburðarhópnum sem fær burðarefni. Hlutfallið á milli meðalfjölgunar í hverjum meðhöndluðum hópi annars vegar og í samskeiða samanburðarhópnum sem fær burðarefni hins vegar, kallað örvunarstuðull, er ákvarðað og verður að vera ≥ 3 til að hægt sé að flokka prófunarefnið sem hugsanlegan húðnæmi. Aðferðirnar, sem er lýst hér, byggjast á merkingu með geislavirku efni í lífi til að mæla fjölgun fruma í fjölgunarferli í dreineitlum í eyra. Þó er hægt að nota aðra endapunkta fyrir mat á fjölda fruma í fjölgunarferli, að því tilskildu að farið sé að öllu leyti að kröfum samkvæmt nothæfisstöðlunum (1. viðbætur).

LÝSING Á GREININGUNNI

Val á dýrategund

- Mýs eru heppilegasta tegundin fyrir þessa prófun. Prófunardýrin skulu vera ungar, fullorðnar kvenmýs, af stofni CBA/Ca eða CBA/J, sem eru eibærar og ekki með fangi. Í upphafi rannsóknarinnar skulu dýrin vera á bilinu 8–12 vikna og breytileiki í þyngd í lágmarki og ekki víkja meira en 20% frá meðalþyngd. Nota má aðra stofna og karldýr í staðinn ef aflað hefur verið nægilegra gagna til að staðfesta að ekki sé um að ræða verulegan mun á svörun eftir stofni og/eða kynjum í eitlagreiningunni.

Aðbúnaður og fóður

- Mýsnar skulu hafðar saman (23. heimild) nema það sé stutt fullnægjandi, vísindalegum rökum að hafa mýsnar hverja í sínu búri. Hitastigið í vistarverum tilraunadýranna skal vera 22 (± 3) °C. Þótt rakastig eigi að vera minnst 30% og helst ekki yfir 70%, nema við þrif á vistarverunum, er kjöraki 50–60%. Nota skal gervilyfningu og hafa til skiptis myrkur og birtu, 12 klukkustundir í senn. Nota má fóður sem er venjulega notað á rannsóknarstofum ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni.

Tilraunadýrin undirbúin

- Dýrin eru valin af handahófi, merkt þannig að hvert og eitt þeirra þekkist (þó ekki með eyrnamerkingu af neinu tagi) og höfð í búrum sínum í a.m.k. fimm daga áður en gjöf skammta hefst til að láta þau aðlagast umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni. Áður en meðferð hefst eru öll dýrin rannsökuð til að ganga úr skugga um að þau hafi engar sýnilegar húðskemmdir.

Tilreiðsla skömmunarlausna

- Íðefni í föstu formi skulu leyst upp eða blönduð í sviflausn með leysum eða burðarefnum og, ef við á, þynnt áður en þau eru borin á eyru músanna. Bera má fljótandi íðefni á óblönduð eða þynnt. Óleysanleg íðefni, t.d. þau sem að jafnaði eru í lækningatækjum, skulu dregin kröftuglega út í viðeigandi leysi til að í ljós komi allir útdraganlegir efnisþættir til prófunar áður en lausnin er borin á eyru músanna. Prófunarefnið skal tilreiða daglega nema gögn um stöðugleika sýni fram á að þau þoli geymslu.

Áreiðanleikakönnun

- Jákvæð samanburðariðefni eru notuð til að sýna fram á tillhyðilegt nothæfi greiningarinnar með því að gefa svaranir með fullnægjandi og samanburðarnákvæmri næmni fyrir næmandi prófunarefni með svörunarstigi sem er vel lýst. Mælt er með því að hafa samskeiða, jákvæðan samanburð þar eð hann sýnir fram á færni rannsóknarstofunnar til að framkvæma hverja greiningu á árangursríkan hátt og gefur færri á mati á samanburðarnákvæmni og samanburðarhæfi innan einstakra rannsóknarstofa og sem og milli rannsóknarstofa. Sum stjórnvöld gera einnig kröfu um jákvæðan samanburð í hverri rannsókn og því eru notendur hvattir til að hafa samráð við viðeigandi yfirvöld áður en þeir gera eitlagreininguna. Til samræmis við það er hvatt til þess að samskeiða, jákvæður samanburður sé notaður að staðaldrí (e. *routine use*) í því skyni að koma í veg fyrir að gera þurfi viðbótarprófanir á dýrum til að uppfylla þær kröfur sem notkun jákvæðs samanburðar með reglubundnu millibili (e. *periodic*) kann að hafa í för með sér (sjá 12.

- mgr.). Jákvæði samanburðurinn á að veita jákvæða svörun í eitlagreiningu við váhrifastyrk sem búist er við að kalli fram hækkun á örvunarstuðlinum sem nemur > 3 umfram neikvæða samanburðarhópin. Skammtastærð jákvæða samanburðarins skal valin þannig að hún valdi ekki óhóflegri húðertingu eða altækum eiturrhifum og örvunin sé samanburðarnákvæm en ekki óhófleg (þ.e. örvunarstuðull, sem er > 20 , teldist óhóflegur). Æskileg, jákvæð samanburðaríðefni eru 25% hexýlsinnamínaldehyð (CAS-nr. (skráningarnúmer Upplýsingaþjónustu um íðefni) 101-86-0) í aseton-ólífuolíublöndu (í rúmmálshlutfallinu 4:1) og 5% merkaptóbensópíasól (CAS-nr. 149-30-4) í *N,N*-dímetýlformamíði (sjá töflu 1 í 1. viðbæti). Við vissar aðstæður má nota önnur jákvæð samanburðarefni sem uppfylla áðurgreindar viðmiðanir enda séu færð gild rök fyrir því.
12. Þó að mælt sé með því að hafa samskeiða, jákvæðan samanburðarhóp með í greiningunni geta prófanir á jákvæða samanburðinum með reglubundnu millibili (þ.e. með millibili sem er ≤ 6 mánuðir) verið fullnægjandi, við vissar aðstæður, fyrir rannsóknarstofur sem framkvæma reglulega eitlagreiningu (þ.e. framkvæma eitlagreiningu ekki sjaldnar en einu sinni í mánuði) og hafa komið sér upp rannsóknarsögulegum gagnagrunni um jákvæðan samanburð sem sýnir fram á getu rannsóknarstofunnar til að fá fram samanburðarnákvæmar og nákvæmar niðurstöður með jákvæðum samanburði. Hægt er að sýna fram á fullnægjandi hæfni til eitlagreiningar á árangursríkan hátt með því að fá fram jákvæðar niðurstöður með jákvæða samanburðinum samfellt í a.m.k. 10 sjálfstæðum prófunum sem eru gerðar innan hæfilegs tíma (þ.e. innan eins árs).
13. Alltaf skal hafa samskeiða, jákvæðan samanburðarhóp með þegar gerðar eru breytingar á tilhögun eitlagreiningar (t.d. breytingar á þjálfuðu starfsfólki, breytingar á efnun og/eða prófefnum í prófunaraðferðinni, breytingar á búnaði í prófunaraðferðinni eða breytingar á uppruna tilraunadýranna) og slíkar breytingar skulu skráðar í skýrslur rannsóknarstofunnar. Huga skal að áhrifum þessara breytinga á hæfni rannsóknarsögulega gagnagrunnsins, sem áður hafði verið komið á fót, þegar tekin er ákvörðun um það hvort nauðsynlegt sé að koma á fót nýjum, rannsóknarsögulegum gagnagrunni til að skrá samkvæmni í niðurstöðum úr jákvæðum samanburði.
14. Rannsakendur skulu hafa það í huga að ákvörðunin um að framkvæma rannsókn með jákvæðum samanburði með reglubundnu millibili í stað þess að hafa hann samskeiða hefur áhrif á það hvort neikvæðar rannsóknarniðurstöður, sem fást án samskeiða, jákvæðs samanburðar á tímabilinu milli reglubundinna rannsókna á jákvæða samanburðinum, teljist fullnægjandi og ásættanlegar. Ef falsneikvæðar niðurstöður fást t.d. í reglubundinni rannsókn á jákvæðum samanburði mætti draga í efa neikvæðar niðurstöður úr prófunarefni sem fást á tímabilinu milli síðustu ásættanlegu, reglubundnu rannsóknarinnar á jákvæða samanburðinum og óásættanlegu, reglubundnu rannsóknarinnar á jákvæða samanburðinum. Áhrif þessara niðurstæðna skal gaumgæfa vandlega þegar tekin er ákvörðun um hvort nota eigi samskeiða, jákvæðan samanburð eða hvort eingöngu eigi að framkvæma prófanir á jákvæðum samanburði með reglubundnu millibili. Einnig þarf að taka til athugunar að nota færri dýr í samskeiða, jákvæða samanburðarhópnum ef vísindaleg rök eru fyrir því og ef rannsóknarstofan sýnir fram á það, með rannsóknarsögulegum gögnum, sértækum fyrir rannsóknarstofuna, að hægt sé að nota færri mýs (12. heimild).
15. Þótt prófa eigi jákvæða samanburðarefnið í burðarefni sem vitað er að kallar stöðugt fram sömu svörun (t.d. í aseton-ólífuolíublöndu í rúmmálshlutfallinu 4:1) geta komið upp tilteknar aðstæður, í tengslum við reglusetningu, þar sem prófanir í óstöðluðu burðarefni (samsetningu sem skiptir máli klínískt eða efnafræðilega) eru einnig nauðsynlegar (24. heimild). Ef samskeiða, jákvæði samanburðurinn er prófaður í öðru burðarefni en prófunarefninu skal hafa sérstakan samanburðarhóp, sem fær burðarefni, fyrir samskeiða, jákvæða samanburðinn.
16. Í þeim tilvikum þegar verið er að meta prófunarefni í tilteknum íðefnaflokki eða með tiltekið svörunarsvið geta viðmiðunarefni einnig verið gagnleg til að sýna fram á að prófunaraðferðin greini rétt húðnæmingarmátt prófunarefna af þessari gerð. Viðeigandi viðmiðunarefni skulu hafa eftirfarandi eiginleika:
- líkindi í byggingu og virkni við efnaflokkinn sem verið er að prófa,
 - þekkta eðlis-/efnafræðilega eiginleika,
 - stuðningsgögn úr eitlagreiningu,
 - stuðningsgögn úr öðrum dýralíkönun og/eða úr mönnum.

PRÓFUNARAÐFERÐ

Fjöldi dýra og skammtastærðir

17. Nota skal a.m.k. fjögur dýr fyrir hvern skammtahóp og a.m.k. þrjú mismunandi styrkleika af prófunarefninu, svo og samskeiða, neikvæðan samanburðarhóp, sem fær einungis meðhöndlun með burðarefni prófunarefnisins, og jákvæðan samanburð (samskeiða eða nýlegan, háð stefnu rannsóknarstofunnar að því er varðar 11.–15. mgr.) Íhuga skal prófun með mismunandi skammtastærðum af jákvæða samanburðinum, einkum ef jákvæði samanburðurinn er prófaður með reglubundnu millibili. Dýrin í samanburðarhópnum skulu fá nákvæmlega sömu meðferð og dýrin í meðferðarhópnum að öðru leyti en því að þau fyrrnefndu fá ekki meðhöndlun með prófunarefninu.

18. Val á skömmtum og burðarefni skal byggjast á ráðleggingunum sem eru gefnar í 3. og 5. heimild. Samfelldir skammtar eru venjulega valdir úr víðeigandi styrkleikaröð, s.s. 100%; 50%; 25%; 10%; 5%; 2,5%; 1%; 0,5% o.s.frv. Valið á styrkleikaröðinni, sem er notuð, skal stutt fullnægjandi, vísindalegum rökum. Taka skal til athugunar allar fyrirbyggjandi eiturefnafræðilegar upplýsingar (t.d. um bráð eiturrif og húðertingu) og upplýsingar um byggingu og eðlisefnafræði prófunarefnisins sem miðað er við (og/eða efnis með skylda efnabyggingu), ef þessar upplýsingar eru tiltækar, þegar valdir eru þrír samfelldir styrkleikar svo að mestu váhrifin verði við mesta styrkinn en komist verði hjá altækum eiturrifum og/eða óhóflegri, staðbundinni húðertingu (3. og 25. heimild). Skorti þessar upplýsingar kann að vera nauðsynlegt að forskima í upphafi (sjá 21.–24. mgr.).
19. Burðarefni má ekki trufla eða bjaga niðurstöðuna úr prófuninni og skal valið með það að markmiði að hámarka leysnina til að fá eins háan styrk og unnt er og jafnframt lausn eða sviflausn sem hentar vel til að gefa efnið. Burðarefni, sem mælt er með, eru asetón-ólífuolíublanda (í rúmmálshlutfallinu 4:1), *N,N*-dímetýlformamíð, metýletýlketón, própýlenglýkól og dímetýlsúlfoxíð (19. heimild) en nota má önnur burðarefni ef færð eru nægileg, vísindaleg rök fyrir því. Í sumum tilvikum getur verið nauðsynlegt að nota leysi, sem hentar út frá klíniskri skírskotun, eða efnablönduna, sem prófunarefnið er selt í á markaði, sem viðbótarsamanburð. Sérstaklega þarf að sjá til þess að vatnssækin prófunarefni, sem halda húðinni votri og renna ekki strax af, séu höfð með burðarefninu með því að hafa víðeigandi uppleysandi efni með (t.d. 1% Pluronic® L92). Þess vegna ber að forðast að nota burðarefni sem eru eingöngu vatnskennd.
20. Með greiningu eitra úr einstökum músum er hægt að meta breytileika milli dýra og gera tölfræðilegan samanburð á muninum á mælingum í hópnum sem fær prófunarefni og samanburðarhópnum sem fær burðarefni (sjá 35. mgr.) Auk þess er gerlegt að meta möguleikann á að fækka músum í jákvæða samanburðarhópnum ef safnað er gögnum um einstök dýr (12. heimild). Einnig krefjast sum stjórnvöld þess að gögn um einstök dýr séu tekin saman. Sum stjórnvöld telja þó safngögn um dýr ásætlanleg og í slíkum tilvikum hafa notendur þann valkost að taka saman annaðhvort einstaklings- eða safngögn um dýr.

Forskimun

21. Ef upplýsingar til ákvörðunar á stærsta skammti sem skal prófaður eru ekki fyrir hendi (sjá 18. mgr.) skal framkvæma forskimun til þess að skilgreina víðeigandi prófunarskammtastærð fyrir eitlagreininguna. Tilgangurinn með forskimun er að veita leiðbeiningar um val á hámarksskammtinum, sem nota skal í meginhluta eitlagreiningarinnar, ef upplýsingar um styrkinn, sem veldur altækum eiturrifum (sjá 24. mgr.) og/eða óhóflegri, staðbundinni húðertingu (sjá 23. mgr.), eru ekki tiltækar. Hámarksskammturinn, sem er prófaður, skal vera prófunarefnið, óþynnt ef það er fljóttandi eða í mesta mögulega styrk ef það er fast efni eða sviflausn.
22. Forskimun er framkvæmd við eins aðstæður og í meginhluta eitlagreiningarinnar, burtséð frá því að mati á frumufjölgun í eitlum er sleppt og hægt er að nota færri dýr í hverjum skammtahóp. Lagt er til að notuð séu eitt til tvö dýr í hverjum skammtahópi. Allar mýs eru skoðaðar daglega til að kanna hvort sjá megi einhver klínísk einkenni um altæk eiturrif eða staðbundna ertingu á áburðarstað. Líkamsþyngd er skráð fyrir prófunina og áður en prófun lýkur (6. dagur). Hörundsroði er skoðaður á báðum eyrum allra músa og gefin stig samkvæmt töflu 1 (25. heimild). Þykkt eynanna er mæld með þykktarmæli (t.d. stafrænum míkromæli eða Peacock Dial-þykktarmæli) á 1. degi (áður en prófunarefni er borið á), á 3. degi (u.þ.b. 48 tímum eftir að prófunarefni er fyrst borið á) og á 6. degi. Á 6. degi er auk þess unnt að ákvarða þykkt eynna með vigtnum sýna sem eru tekin úr eyrunum með sýnistöng eftir að dýrin hafa verið aflífuð á mannúðlegan hátt. Hörundsroðastig, sem eru ≥ 3 , og/eða eynaþykkt, sem er $\geq 25\%$, á einhverjum mælingadaganna bendir til óhóflegrar, staðbundinnar húðertingar (26. og 27. heimild). Stærsti skammturinn, sem er valinn fyrir meginhluta eitlagreiningarinnar, er næststærsti skammturinn í styrkröð forskimunarinnar (sjá 18. mgr.) sem veldur ekki altækum eiturrifum og/eða óhóflegri, staðbundinni húðertingu.

Tafla 1

Hörundsroðastig

Athugun	Stig
Enginn hörundsroði	0
Örlítill hörundsroði (vart sjáanlegur)	1
Greinilegur hörundsroði	2
Hörundsroði í meðallagi eða mikill	3
Mikill hörundsroði (purpuraröði) eða brunaskorpumyndun sem hindrar stigagjöf fyrir hörundsroða	4

23. Auk 25% þykkunar eyra (26. og 27. heimild) hefur tölfraðilega marktæk aukning í þykkun eyra hjá meðhöndluðum músum, umfram þykkun hjá músum í samanburði, einnig verið notuð til að greina ertandi efni í eitlagreiningunni (28.–34. heimild). En þó að tölfraðilega marktæk aukning geti orðið ef eyrnaþykkt er minni en 25% hefur hún þó ekki verið tengd sérstaklega við óhóflega ertingu (30.–34. heimild).
24. Eftirfarandi klínískar athuganir geta gefið til kynna altæk eiturrhrif (35. og 36. heimild), ef þær eru notaðar sem hluti af samþættu mati, og þannig verið vísbending um þann hámarksksammt sem nota skal í meginhluta eitlagreiningarinnar: breytingar á starfsemi taugakerfisins (t.d. hárris, slingur, skjálfti og krampi), hegðunarbreytingar (t.d. árásarhneigð, breytingar á snyrtingu, greinilegar breytingar á virkni), breytingar á öndunarmynstri (þ.e. breytingar á tíðni andardráttar og krafti öndunar, s.s. andnaud, andköf og brakhljóð) og breytingar á fόδur- og vatnsneyslu. Matið skal auk þess taka tillit til merkja um sinnuleysi og/eða skort á viðbrögðum og til allra klínískra einkenna um meira en vægan eða skammlífán sársauka og þjáningar eða > 5% minnkun á líkamsþyngd frá 1. degi til 6. dags, auk dánarhlutfalls. Dauðvona dýr og dýr, sem sýna merki um sársauka eða mikla og viðvarandi þjáningu, skal aflífa á mannúðlegan hátt (37. heimild).

Tilraunaáætlun meginrannsóknar

25. Tilraunaáætlunin fyrir greininguna er sem hér segir:

- 1. dagur: Hvert dýr skal auðkennt og vegið og þyngd þess og allar klínískar athuganir skráðar. Bornir eru 25 μ l af prófunarefninu, hæfilega þynntu, af burðarefninu eingöngu eða jákvæða samanburðinum (samskeiða eða nýlegum, háð stefnu rannsóknarstofunnar að því er varðar 11.–15. mgr.) aftan á bæði eyrum.
- 2. og 3. dagur: Borið er aftur á dýrin eins og á 1. degi.
- 4. og 5. dagur: Engin meðhöndlun.
- 6. dagur: Þyngd hvers dýrs er skráð. 250 μ l af dauðhreinsaðri fosfatjafnaðri saltlausn (PBS), sem inniheldur 20 μ Ci ($7,4 \times 10^5$ Bq) af þrívetnisbundnu (3 H)-metýltýmíðíni, er sprautað í rófubláæð allra prófunar- og samanburðarmúsa. Að öðrum kosti er 250 μ l af dauðhreinsaðri, fosfatjafnaðri saltlausn, sem inniheldur 2 μ Ci ($7,4 \times 10^4$ Bq) af 125 I-joðdeoxýúridíni og 10^{-5} M flúordeoxýúridíni, sprautað í rófubláæð allra músanna. Fimm tímum síðar skulu öll dýrin aflífuð á mannúðlegan hátt. Dreineitlarnir eru skornir úr hvoru eyra músanna og settir, sér fyrir hvert dýr, í fosfatjafnaða saltlausn (PBS) (stakdýrsaðferð). Einnig er hægt að skera eitlana úr hvoru eyra, hópa þá og setja í fosfatjafnaða saltlausn fyrir hvern meðferðarhóp (aðferð með hópuðum meðferðarhópi) Nákvæmar upplýsingar og skýringarmyndir af greiningu og krufningu eitla er að finna í 12. heimild. Til að vakta enn frekar staðbundna húðsvörun í meginrannsókninni er hægt að hafa viðbótarmæliþætti með í rannsóknaráætluninni, s.s. stig fyrir hörundsroða á eyra eða mælingar á þykkt eyra (fengnar annaðhvort með því að nota þykktarmæli eða með vigtnum sýna, teknum með sýnistöng úr eyrum við krufningu).

Tilreiðsla frumusvíflausna

26. Svíflausn með stökum eitilfrumum sem eru skornar úr báðum eyrum, annaðhvort með stakdýrsaðferðinni eða aðferðinni með hópuðum meðferðarhópi, er tilreið með vægri, vélrænni aðgreiningu gegnum 200 μ m móska net úr ryðfríu stáli eða með annarri ásættanlegri tækni til að framleiða svíflausn með stökum eitilfrumum. Eitilfrumurnar eru þvegnar tvisvar með umfram magni af fosfatjafnaðri saltlausn og erfðaeftið fellt út með 5% triklóredíksýru við 4 °C í 18 klst. (3. heimild). Köggjum er annaðhvort þyrllað upp aftur í 1 ml af triklóredíksýru og þeir fluttir yfir í sindurmælingaglós, sem innihalda 10 ml af sindurvökva fyrir 3 H-talningu, eða fluttir beint í gammatalningarmæliglas fyrir 125 I-talningu.

Ákvörðun á frumfölgun (upptekin geislavirkni)

27. Upptekið 3 H-metýltýmíðín er mælt með β -sindurtalningu sem sundrun á mínútu (e. *disintegrations per minute (DPM)*). Upptekið 125 I-joðdeoxýúridín er mælt með 125 I-talningu og er einnig tilgreint sem sundrun á mínútu. Upptakan er gefin upp sem sundrun á mínútu á hverja mús (stakdýrsaðferð) eða sundrun á mínútu á hvern meðferðarhóp (aðferð með hópuðum tilraunahópi), eftir því hvor aðferðin er notuð.

Einfölduð eitlagreining

28. Í sumum tilvikum, ef það er lagaleg þörf á að staðfesta neikvæða spá um húðnæmingarmátt, er heimilt að nota einfölduðu eitlagreininguna sem útheimtir færri dýr (16.–18. heimild), að því tilskildu að öllum öðrum forskriftum aðferðarlýsingar fyrir eitlagreiningu sé fylgt, eins og lýst er í þessari prófunaraðferð. Áður en einfölduðu eitlagreiningunni er beitt skal leggja fram skýr rök og visindalegar forsendur fyrir notkun hennar. Ef niðurstöðurnar eru jákvæðar eða tvíræðar getur þurft viðbótarprófanir til að fá skýra niðurstöðu eða túlka hana.

29. Eini munurinn á aðferðarlýsingum fyrir prófunaraðferðir eitlagreiningar og einfaldaðrar eitlagreiningar er fækkun á skammtahópum og þess vegna veitir einfölduð eitlagreining ekki upplýsingar um skammtasvörun. Því skal ekki nota einfölduðu eitlagreininguna ef þörf er á upplýsingum um skammtasvörun. Eins og í fjölskammtaeitlagreiningunni skal styrkur prófunarefnisins, sem er metinn í einfölduðu eitlagreiningunni, vera sá hámarksstyrkur sem veldur ekki augljósum, altækum eiturrhifum og/eda óhóflegri, staðbundinni húðertingu hjá músum (sjá 18. mgr.)

ATHUGANIR

Klínískar athuganir

30. Hver mús skal skoðuð gaumgæfilega a.m.k. einu sinni á dag til að kanna hvort sjá megi einhver klínísk einkenni hjá dýrunum, annaðhvort um staðbundna ertingu á áburðarstað eða altæk eiturrhif. Skrá skal allar athuganir kerfisbundið í sérstaka skrá fyrir hvert dýr. Vöktunaráætlanir skulu fela í sér viðmiðanir til að greina þegar í stað þær mys sem sýna altæk eiturrhif, óhóflega, staðbundna húðertingu eða húðætingu og skulu aflifaðar (37).

Líkamsþyngd

31. Eins og tilgreint er í 25. mgr. skal vigta hvert dýr við upphaf prófunar og þegar dýrið er aflifað á mannóðlegan hátt samkvæmt áætlun.

ÚTREIKNINGUR Á NIÐURSTÖÐUM

32. Niðurstöður fyrir hvern meðferðarhóp eru gefnar upp sem örvunarstuðull. Þegar stakdýrsaðferðin er notuð er örvunarstuðullinn fenginn með að deila í meðaltal sundrunar á mínútu/mús innan hvers hóps sem fær prófunarefnið og í meðaltalið innan jákvæða samanburðarhópsins með meðaltali sundrunar á mínútu/mús í samanburðarhópnum sem fær leysi eða burðarefni. Meðalörvunarstuðullinn fyrir samanburðarhópin, sem fær burðarefni, er þá 1. Þegar aðferðin með hópuðum tilraunahópi er notuð fæst örvunarstuðullinn með því að deila í hópaða, upptekna geislavirkni í hverjum meðferðarhópi með upptökunni hjá hópuðum samanburðarhópi sem fær burðarefni. Þannig fæst meðalörvunarstuðull.
33. Í ákvörðunarferlinu er litið svo á að niðurstaða sé jákvæða ef örvunarstuðullinn er ≥ 3 . Þó má einnig nota styrk skammtasvörunar, tölfræðilega marktækni og samkvæmni í svörunum, sem fást með leysi eða burðarefni og jákvæða samanburðinum, við ákvörðun á því hvort líta skuli á óvissar niðurstöður (e. *borderline result*) sem jákvæðar (4.–6. heimild).
34. Ef nauðsynlegt reynist að skýra fengnar niðurstöður skal huga að ýmsum eiginleikum prófunarefnisins, þ.m.t. hvort það er skylt þekktum húðnæmum að byggingu, hvort það veldur óhóflegri, staðbundinni húðertingu hjá músum og hvert er eðli tengslanna sem fram koma milli skammts og svörunar. Fjallað er ítarlega um þetta og önnur atriði annars staðar (7. heimild).
35. Ef gögn um geislavirkni eru tekin saman fyrir einstakar mys gefur það færi á tölfræðilegri greiningu á tilvist og umfangi tengslanna milli skammts og svörunar í gögnunum. Tölfræðilegt mat getur falið í sér mat á tengslunum milli skammts og svörunar sem og samanburð á prófunarhópum sem er aðlagður á viðeigandi hátt (t.d. meðhöndlaður hópur, paraður á móti samskeiða samanburðarhópi sem fær burðarefni). Tölfræðileg greining getur t.d. falið í sér línulegt aðhvarf eða Williams-prófun, til að meta leitni í skammtasvörun, og Dunnett-prófun fyrir samanburð para. Þegar velja skal viðeigandi aðferð fyrir tölfræðilega greiningu þarf rannsakandi að vera meðvitaður um hugsanlegan ójöfnuð í dreifni og önnur skyld vandamál sem kunna að útheimta umbreytingu gagna eða tölfræðilega greiningu án breytna. Hvað sem öðru líður kann rannsakandinn að þurfa að reikna út örvunarstuðla og gera tölfræðilegar greiningar með og án tiltekinnar gagnapunkta (sem eru stundum kallaðir einfara (e. *ouliers*)).

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Gögn

36. Gögn skulu tekin saman í töflu. Ef stakdýrsaðferðin er notuð skal sýna gildi sundrunar á mínútu fyrir einstök dýr, hópmeðaltal sundrunar á mínútu/dýr, skekkjuliði þess (t.d. staðalfrávik, staðalskekkju meðaltalsins), og samanburð á meðalörvunarstuðli fyrir hvern skammtahóp og samskeiða samanburðarhópin sem fær burðarefni. Ef notuð er aðferðin með hópuðum meðferðarhópi skal sýna meðaltal eða miðgildi sundrunar á mínútu og meðalörvunarstuðul fyrir hvern skammtahóp, borið saman við samskeiða samanburðarhópin sem fær burðarefni.

Prófunarskýrsla

37. Prófunarskýrslan skal innihalda eftirfarandi upplýsingar:

Prófunar- og samanburðarefni:

- auðkennissöggn (t.d. CAS- og EB-númer, liggja þau fyrir, uppruni, hreinleiki, þekkt óhreinindi, lotunúmer),
- eðlisástand og eðlisefnafræðilegir eiginleikar (t.d. rokgirni, stöðugleiki og leysni),

- ef um blöndu er að ræða: samsetning og innbyrðis hlutfall efnisþátta.

Leysir og burðarefni:

- auðkennisgögn (hreinleiki, styrkur, ef við á, og rúmmál efnis sem er notað),
- rök fyrir vali á burðarefni.

Tilraunadýr:

- uppruni músa af stofni CBA,
- örverufræðilegt ástand dýranna, ef það er þekkt,
- fjöldi og aldur dýranna,
- uppruni dýranna, aðbúnaður, fóður o.s.frv.

Prófunaraðstæður:

- upplýsingar um tilreiðslu prófunarefnis og hvernig það er borið á,
- rök fyrir vali á skömmtum (þ.m.t. niðurstöður úr forskimun ef hún er gerð),
- styrkur burðarefnis og prófunarefnis og heildarmagn prófunarefnis sem er borið á,
- upplýsingar um gæði fóðurs og vatns (þ.m.t. tegund og uppruni fóðurs og uppruni vatns),
- upplýsingar um meðferðar- og sýnatökuáætlanir,
- aðferðir við mælingar á eiturrhifum,
- viðmiðanir til að meta hvort niðurstöður rannsókna séu jákvæðar eða neikvæðar,
- upplýsingar um öll frávik frá aðferðarlýsingum og skýring á því hvaða áhrif frávikin hefur á tilhögun og niðurstöður rannsóknarinnar.

Áreiðanleikakönnun:

- samantekt á niðurstöðum síðustu áreiðanleikakönnunar, þ.m.t. upplýsingar um prófunarefni, styrk og burðarefni,
- samskiða og/eða rannsóknarsöguleg gögn prófunarstofunnar varðandi jákvæðan samanburð og samskiða gögn um neikvæðan samanburð,
- ef samskiða, jákvæður samanburður var ekki hafður með: gögn og rannsóknarstofuskýrsla um nýjasta reglubundna, jákvæða samanburðinn og skýrsla með upplýsingum um rannsóknarsöguleg gögn um jákvæðan samanburð rannsóknarstofunnar ásamt rökum fyrir því að ekki var framkvæmdur samskiða, jákvæður samanburður.

Niðurstöður:

- þyngd hverrar músar við upphaf skömmtunar og við aflifun samkvæmt áætlun, sem og meðaltal og skekkjuliðir (t.d. staðalfrávik, staðalskekkja meðaltals) fyrir hvern meðferðarhóp,
- tíminn þegar eiturrhifa varð vart og hvernig þau þróast, þ.m.t. húðerting, ef einhver er, á áburðarstað, fyrir hvert dýr,
- tafla yfir gildi sundrunar á mínútu fyrir hverja mús (stakdýrsaðferð) eða meðaltal/miðgildi hennar (aðferð með hópuðum meðferðarhópi) og örvunarstuðulsgildi fyrir hvern meðferðarhóp,

- meðaltal og skekkjuliðir (t.d. staðalfrávik, staðalskekkingja meðaltals) fyrir sundrun á mínútu/mús fyrir hvern meðferðarhóp og niðurstöður greiningar á einförum fyrir hvern meðferðarhóp ef stakdýrsaðferðin er notuð,
- útreiknaður örvunarstuðull og viðeigandi mælingar á breytileika sem taka tillit til breytileika milli dýra, bæði í prófunarefnishópum og samanburðarhópum ef stakdýrsaðferðin er notuð,
- tengsl milli skammts og svörunar,
- tölfræðileg greining ef við á.

Umræða um niðurstöður:

- Stuttar athugasemdir um niðurstöður, greining á skammtasvörun og tölfræðileg greining, eftir því sem við á, með ályktun um það hvort prófunarefnið skuli teljast húðnæmir.

HEIMILDIR

- 1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Aðgengilegt á: [<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. Aðgengilegt á: [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. Aðgengilegt á: [<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. Aðgengilegt á: [<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. Aðgengilegt á: [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. Aðgengilegt á: [<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. Aðgengilegt á: [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. Aðgengilegt á: [<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. Aðgengilegt á: [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. Aðgengilegt á: [<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. Aðgengilegt á: [<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, aðgengilegt á: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acute/tox/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. Aðgengilegt á: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

I. viðbætur

Nothæfisstaðlar fyrir mat á tillögðum, samsvarandi eða breyttum prófunaraðferðum við eitlagreiningu með tilliti til húðnæmingar

INNGANGUR

1. Tilgangurinn með nothæfisstöðlum er að tilgreina á hvaða grundvelli hægt sé að ákvarða hvort nýjar prófunaraðferðir, bæði eignarréttarvarðar (þ.e. með höfundarrétti, vörumerki eða skráðar) og þær sem eru ekki eignarréttarvarðar, séu nægilega nákvæmar og áreiðanlegar miðað við tiltekinn tilgang með prófuninni. Nota má þessa nothæfisstaðla, sem byggjast á fullgiltum og samþykktum prófunaraðferðum, til að meta áreiðanleika og nákvæmni annarra samsvarandi aðferða (hliðstæðra prófana) sem eru byggðar á samsvarandi vísindalegum meginreglum og sem mæla eða spá fyrir um sömu líffræðilegu áhrif eða eiturrif (14. heimild).
2. Áður en breyttar aðferðir (þ.e. tillagðar, hugsanlegar úrbætur á viðurkenndri prófunaraðferð) eru samþykktar skal fara fram mat til að ákvarða áhrif tillögðu breytinganna á nothæfi prófunarinnar og mat á því að hvaða marki breytingarnar hafa áhrif á fyrirliggjandi upplýsingar varðandi aðra þætti í fullgildingarferlinu. Háð fjölda og eðli tillögðu breytinganna, gagnanna, sem aflað hefur verið vegna þeirra, og fylgiskjala til stuðnings breytingunum skulu þær annaðhvort fara í sama fullgildingarferli og lýst er fyrir nýja prófun eða, ef við á, í takmarkað mat á áreiðanleika og gildi þar sem stuðst er við viðurkennda nothæfisstaðla (14. heimild).
3. Meta skal samsvarandi eða breyttar aðferðir, sem lagt er til að notaðar séu í tengslum við þessa prófunaraðferð, til að ákvarða áreiðanleika þeirra og nákvæmni með iðefnum sem eru dæmigerð fyrir allt stigavið eitlagreiningarinnar. Til að koma í veg fyrir óréttmæta notkun á dýrum er mælt eindregið með því að þeir sem hanna líkönin hafi samráð við hlutaðeigandi yfirvöld áður en þeir hefja fullgildingarrannsóknir í samræmi við nothæfisstaðlana og leiðbeiningarnar sem fylgja þessari prófunaraðferð.
4. Nothæfisstaðlarnir byggjast á samræmdum nothæfisstöðlum, frá samræmingarnefnd stofnana um fullgildingu staðgönguáðferða í Bandaríkjunum (ICCVAM), Evrópumíðstöð um fullgildingu staðgönguáðferða (ECVAM) og miðstöð Japans fyrir fullgildingu staðgönguáðferða (JaCVAM) (12. heimild), fyrir mat á gildi (e. *validity*) samsvarandi og breyttra útgáfa af eitlagreiningunni. Nothæfisstaðlarnir samanstanda af grundvallarþáttum prófunaraðferðarinnar, ráðlögðum viðmiðunariðefnum og stöðlum fyrir nákvæmni og áreiðanleika sem tillagða aðferðin skal að lágmarki uppfylla.

I. Grundvallarþættir prófunaraðferðar

5. Til að tryggja að samsvarandi eða breytt aðferð við eitlagreiningu sé hliðstæð eitlagreiningunni með tilliti til virkni og verkunarmáta og mæli sömu líffræðileg áhrif skulu eftirfarandi þættir hafðir með í aðferðarlýsingu fyrir prófunaraðferðina:

- prófunarefnið skal borið á bæði eyru músarinnar,
- fjölgun eartilfrumna skal mæld í dreitlunum við staðinn þar sem prófunarefnið var borið á,
- fjölgun eartilfrumna skal mæld í örvunarfasa húðnæmingarinnar,
- stærsti skammtur prófunarefna, sem er valinn, skal vera hámarksstyrkurinn sem veldur ekki altækum eiturrifum og/eða óhóflegri, staðbundinni húðertingu hjá músum, Mesti skammtastyrkur jákvæðs viðmiðunariðefnis skal vera a.m.k. jafnmikill og EC3-gildi (e. *estimated concentration needed to produce a stimulation index of 3: sá styrkur sem áætlað er að þurfi til að ná örvunarstuðlinum 3*) samsvarandi viðmiðunariðefna (sjá töflu 1) án þess að hann framkalli altæk eiturrif og/eða óhóflega, staðbundna húðertingu hjá músum,
- í öllum rannsóknum skal vera samskeiða samanburðarprófun með burðarefni og, eftir því sem við á, einnig samskeiða, jákvæður samanburður,
- nota skal a.m.k. fjögur dýr fyrir hvern skammtahóp,
- annaðhvort má taka saman einstaklingsgögn eða safngögn um dýr.

Ef þessar viðmiðanir eru ekki uppfylltar er ekki hægt að nota þessa nothæfisstaðla til fullgildingar á samsvarandi eða breyttum aðferðum.

II. Lágmarksskrá yfir viðmiðunariðefni

6. Í samræmdum nothæfisstöðlum frá samræmingarnefnd stofnana um fullgildingu staðgönguaðferða í Bandaríkjunum (ICCVAM), Evrópumíðstöð um fullgildingu staðgönguaðferða (ECVAM) og miðstöð Japans fyrir fullgildingu staðgönguaðferða (JaCVAM) (12. heimild) eru tilgreind 18 viðmiðunariðefni, sem skal nota að lágmarki, og fjögur valkvæð viðmiðunariðefni (þ.e. efni sem framkalla annaðhvort falsjákvæðar eða falsneikvæðar niðurstöður í eitlagreiningunni í samanburði við niðurstöður úr prófununum á mönnum og naggrísam (B.6 eða OECD-viðmiðunarregla 406 um prófanir) (13. heimild) og gefa því færi á að sýna fram á nothæfi sem er það sama og nothæfi eitlagreiningarinnar eða meira sem eru höfð með í nothæfisstöðlum fyrir eitlagreiningu. Viðmiðanir fyrir vali á þessum íðefnum voru:

- Í skránni voru viðmiðunariðefni sem voru dæmigerð fyrir þær tegundir efna, sem eru að jafnaði prófuð með tilliti til húðnæmingarmáttar, og svörunarsviðið sem hægt er að mæla eða spá fyrir um með eitlagreiningu.
- Efnafræðileg bygging efnanna var vel skilgreind.
- Gögn úr eitlagreiningu á naggrísam (þ.e. B.6, OECD-viðmiðunarregla 406 um prófanir) (13. heimild) og, ef unnt var, gögn um áhrif á menn voru fyrirbyggjandi fyrir hvert efni og
- auðvelt var að fá efnin á almennum markaði.

Ráðlögðu viðmiðunariðefnin eru tilgreind í töflu 1. Þegar tillögð viðmiðunariðefni eru notuð í rannsóknum skulu þau metin í því burðarefni sem þau eru skráð með í töflu 1. Ef efni í skránni er ekki tiltækt er heimilt að nota önnur efni sem uppfylla framangreindar valviðmiðanir ef rökstuðningur með því er fullnægjandi.

Tafla 1
Ráðlögð viðmiðunartöl fyrir nothæfisstaðla eitlagreiningar

Númer	Íöfnir ⁽¹⁾	CAS-nr.	Form	Burðarefni ⁽²⁾	EC3% ⁽³⁾	N ⁽⁴⁾	0,5x-2,0x EC3	Mælt EC3- styrkbil	LLNA m.v. NG	LLNA m.v. menn
1	5-klór-2-metýl-4-ísópíasólín-3-ón (CMI)/2-metýl-4-ísópíasólín-3-ón (MI) ⁵	26172-55-4/ 2682-20-4	Vökvi	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	EÚ	+/+	+/+
2	DNKB	97-00-7	Fast efni	AÓO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-fenýlendiamín	106-50-3	Fast efni	AÓO	0,11	6	0,055-0,22	007-0,16	+/+	+/+
4	Kóbaltklórít	7646-79-9	Fast efni	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Ísövegól	97-54-1	Vökvi	AÓO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-merkaptóbensópíasól	149-30-4	Fast efni	DMF	1,7	1	0,85-3,4	EÚ	+/+	+/+
7	Sítral	5392-40-5	Vökvi	AÓO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HSA	101-86-0	Vökvi	AÓO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Eygenól	97-53-0	Vökvi	AÓO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Fenýlbensóat	93-99-2	Fast efni	AÓO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Símmamínkóhól	104-54-1	Fast efni	AÓO	21	1	10,5-42	EÚ	+/+	+/+
12	Ímídasólídínúrea	39236-46-9	Fast efni	DMF	24	1	12-48	EÚ	+/+	+/+
13	Metýlmetakrýlat	80-62-6	Vökvi	AÓO	90	1	45-100	EÚ	+/+	+/+
14	Klórbenzen	108-90-7	Vökvi	AÓO	25	1	ÁEV	ÁEV	-/-	-(*)
15	Ísoprópanól	67-63-0	Vökvi	AÓO	50	1	ÁEV	ÁEV	-/-	+/+
16	Mjólkursýra	50-21-5	Vökvi	DMSO	25	1	ÁEV	ÁEV	-/-	-(*)
17	Metýlsalísýlat	119-36-8	Vökvi	AÓO	20	9	ÁEV	ÁEV	-/-	-/-
18	Salísýlsýra	69-72-7	Fast efni	AÓO	25	1	ÁEV	ÁEV	-/-	-/-

Númer	Íöfnin ⁽¹⁾	CAS-nr.	Form	Burðarefni ⁽²⁾	EC3%(³)	N ⁽⁴⁾	0,5x-2,0x EC3	Mælt EC3-styrkibil	LLNA m.v. NG	LLNA m.v. menn
Valkvæð efni til að sýna fram á bætt nothæfi í sambandi við LLNA										
19	Natríumlárylsulfat	151-21-3	Fast efni	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/-	+/-
20	Etylenglykóldímetylakrýlat	97-90-5	Vökvi	MEK	28	1	14-56	EÚ	+/-	+/+
21	Xýlen	1330-20-7	Vökvi	AÓO	95,8	1	47,9-100	EÚ	+/(**)	+/-
22	Nikkelkörtó	7718-54-9	Fast efni	DMSO	5	2	ÁEV	ÁEV	-/+	-/+

Skammtafanir: AÓO = aseton-ólífuolíublanda (í rúmmálshlutfallinu 4:1), CAS-númer = skráningarnúmer Upplysingabjónustu um iöfni, DMF = *N,N*-dímetýlformamíð, DMSO = dímetýlsúlfoxíð, DNKB = 2,4-dínitróklórbenzen, EC3 = áætlaður styrkur prófunarefnis sem þarf til að fæ örvunarstuðulinn 3, NG = niðurstöður úr prófun á naggrísnum (þ.e. B.6 eða OECD-viðmiðunarrégla 406 um prófanir) (13. heimild), HSA = hexylsinnamínaldehyð, LLNA = niðurstöður úr eitlagreiningu á dýrum af mýsaætt (þ.e. B.42 eða OECD viðmiðunarrégla 429 um prófanir) (1. heimild), MEK = metýletylketón, ÁEV = á ekki við þar eð örvunarstuðull er < 3, EÚ = engir útreikningar þar eð gögn eru úr einni rannsókni, BE = burðarefni prófunar.

(*) Ekki talinn húðnemir í mönnum þar eð ekki fundust neinar niðurstöður úr klínískum plástursprófunum, efnið er ekki tekið með sem ofnæmisvaldur í plástursprófunarsettum og ekki var hægt að finna neinar ferilskýrslur um næmingu lífa mönnum.

(**) Gögn úr prófunum á naggrísnum liggja ekki fyrir.

(1) Íöfnin skal tilreiða daglega nema gögn um stöðugleika sýni fram á að þau þoli geymslu.

(2) Vegna mögulegra áhrifa mismunandi burðarefna á nothæfi LLNA skal nota burðarefnið sem mælt er með fyrir hvert viðmiðunarefni (24. og 32. heimild).

(3) Meðalgildi ef fleiri en eitt EC3-gildi voru tiltekið. Nota skal mesta styrk sem er prófaður (þ.e. með örvunarstuðul < 3) fyrir neikvæð efni.

(4) Fjöldi eitlagreiningarrannsókna sem gögn voru fengin úr.

(5) Fæst á almennum markaði sem Kathon CG (CAS-nr. 55965-84-9) og er blanda af CMI og MI í hlutföllum 3:1. Hlutfallsstyrkur hvers efnisþáttar er á bilinu 1,1%-1,25% (CMI) og 0,3%-0,45% (MI). Óvirkir efnisþættir eru magnesíumsólt (21,5%-24%) og koparnítrat (0,15%-0,17%) og það sem eftir er af samsetningunni er 74%-77% vatn. Kathon CG er auðfengið frá Sigma-Aldrich og Rohm and Haas (nú Dow Chemical Corporation).

III. Skilgreindir staðlar fyrir áreiðanleika og nákvæmni

7. Nákvæmni samsvarandi eða breyttrar aðferðar við eitlagreiningu skal a.m.k. uppfylla nothæfisstaðla fyrir eitlagreiningu þegar hún er metin með viðmiðunariðefnunum 18 sem skal að lágmarki nota. Nýja eða breytta aðferðin skal leiða til réttar flokkunar á grundvelli ákvörðunar með svarkostunum „já“ eða „nei“. Nýja eða breytta aðferðin getur þó hugsanlega ekki flokkað rétt öll viðmiðunariðefnin sem skal að lágmarki nota. Ef einn af vægari næmunum er t.d. rangflokkaður má líta svo á að rökstuðningur fyrir rangflokkinum og viðeigandi viðbótargögn (t.d. niðurstöður úr prófunum sem gefa rétta flokkun fyrir önnur efni með eðliseiginleika og efnafræðilega og næmandi eiginleika sem eru samsvarandi eiginleikum viðmiðunariðefnisins sem var rangflokkað) sýni fram á jafngilt nothæfi. Við slíkar aðstæður væri fullgildingarstaða nýju eða breyttu aðferðarinnar við eitlagreiningu metin í hverju tilviki fyrir sig.

Einseturssamanburðarnákvæmni

8. Til að ákvarða einseturssamanburðarnákvæmni nýrrar eða breyttrar aðferðar við eitlagreiningu skal hún metin með því að nota næmandi efni sem hefur eiginleika sem er vel lýst í eitlagreiningu. Nothæfisstaðlar eitlagreiningar eru því byggðir á breytileika niðurstaðna úr endurteknum prófunum á hexýlsinnamínaldehýði. ECt-gildi (gildi áætlaðs styrkleikaþröskulds (e. *estimated concentration threshold (ECT)*)) fyrir hexýlsinnamínaldehýð, til mats á einseturssamanburðarnákvæmni, skulu fengin úr fjórum mismunandi prófunum með a.m.k. viku millibili milli prófana. Ásættanleg einseturssamanburðarnákvæmni er tilgreind með getu rannsóknarstofu til að fá fram ECt-gildi á milli 5%–20% í hverri prófun með hexýlsinnamínaldehýði, sem svarar til styrksviðsins 0,5–2,0 sinnum EC3-meðalgildið sem er tilgreint fyrir hexýlsinnamínaldehýð í eitlagreiningunni (sjá töflu 1).

Fjölsetra samanburðarnákvæmni:

9. Til að ákvarða fjölsetra samanburðarnákvæmni nýrrar eða breyttrar aðferðar við eitlagreiningu skal hún metin með því að nota tvö næmandi efni sem hafa eiginleika sem er vel lýst í eitlagreiningunni. Nothæfisstaðlar fyrir eitlagreininguna byggjast á breytileika niðurstaðna úr prófunum á hexýlsinnamínaldehýði og 2,4-dínítróklórbenseni hjá mismunandi rannsóknarstofum. ECt-gildi skulu fengin úr sjálfstæðri, stakri prófun sem er gerð á a.m.k. þremur mismunandi rannsóknarstofum. Til að sýna fram á ásættanlega, fjölsetra samanburðarnákvæmni skal hver rannsóknarstofa fá fram ECt-gildi á milli 5%–20% fyrir hexýlsinnamínaldehýð og 0,025%–0,1% fyrir dínítróklórbensen, sem svarar til styrksviðsins 0,5–2,0 sinnum EC3-meðalgildið sem er tilgreint fyrir hexýlsinnamínaldehýð (10%) og dínítróklórbensen (0,05%) í eitlagreiningunni (sjá töflu 1).

2. viðbætur

Skilgreiningar

Nákvæmni: Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktu viðmiðunargildi niðurstaða úr prófun er. Nákvæmni er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferða og einn þáttur gildis (e. *relevance*). Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörum“ til að lýsa hlutfalli réttra niðurstaðna úr prófunaraðferð (14. heimild).

Viðmiðunarefni Efni sem er næmandi eða ekki næmandi og er notað sem viðmiðunarstaðall fyrir prófunarefni. Viðmiðunarefni skal hafa eftirfarandi eiginleika: i) einsleitan og áreiðanlegan uppruna, ii) líkindi í byggingu og virkni við efnaflokkinn (e. *class of substances*) sem er verið að prófa, iii) þekkta eðlisefnafræðilega eiginleika, iv) stuðningsgögn um þekkt áhrif og v) þekktan mátt á sviði æskilegrar svörunar.

ECt (áætlaður styrkleikaþröskuldur (e. Estimated Concentration Threshold)): Sá áætlaði styrkur prófunarefnis sem þarf til að fá örvarstuðul sem er visbending um jákvæða svörum.

EC3 (áætlaður styrkur þrjár (e. estimated concentration three)): Sá áætlaði styrkur prófunarefnis sem þarf til að fá örvarstuðulinn þrjá.

Falsneikvætt efni: Prófunarefni sem er ranglega greint sem neikvætt eða óvirkt með tiltekinni prófunaraðferð þegar það er í raun jákvætt eða virkt.

Falsjákvætt efni: Prófunarefni sem er ranglega greint sem jákvætt eða virkt með tiltekinni prófunaraðferð þegar það er í raun neikvætt eða óvirkt.

Hætta: Möguleikinn á skaðlegum áhrifum á heilbrigði eða skaðlegum, vistfræðilegum áhrifum. Skaðlegu áhrifin koma aðeins fram ef umfang váhrifa er nógu mikið.

Fjölsetra samanburðarnákvæmni: Mæling á því að hvaða marki mismunandi rannsóknarstofur með réttindi og hæfi, sem nota sömu aðferðarlýsingu og gera prófanir á sömu prófunarefnum, komast að niðurstöðum sem eru eigindlega og megindlega samsvarandi. Fjölsetra samanburðarnákvæmni, einnig kölluð samanburðarnákvæmni milli rannsóknarstofa, er ákvörðuð meðan á forfullgildingar- og fullgildingarferlinu stendur og gefur til kynna að hvaða marki tekst að flytja prófun með fullnægjandi hætti á milli rannsóknarstofa (14. heimild).

Einseturssamanburðarnákvæmni: Ákvörðun á því að hvaða marki fólk með réttindi og hæfi og á sömu rannsóknarstofu tekst með fullnægjandi hætti að endurtaka niðurstöður með notkun tilgreindrar aðferðarlýsingar á mismunandi tímum. Einnig kölluð samanburðarnákvæmni innan rannsóknarstofu (14. heimild).

Hliðstæð prófun (e. Me-too test): Heiti úr talmáli á prófunaraðferð sem er sambærileg fullgiltum og samþykktum viðmiðunaraðferðum að skipulagi og virkni. Slík prófunaraðferð kæmi til greina við flýtifullgildingu (e. *catch-up validation*). Notað sem samheiti við „samsvarandi prófunaraðferð“ (14. heimild).

Einfari: Einfari er mæling sem er greinilega öðruvísi en önnur gildi í slembisýni úr hópi.

Nothæfisstaðlar: Staðlar, byggðir á fullgilti prófunaraðferð, sem eru grundvöllur fyrir mat á samanburðarhæfi tillagðrar prófunaraðferðar sem er samsvarandi fullgiltu aðferðinni með tilliti til virkni og verkunarmáta. Þeir fela í sér: i) grundvallarþætti prófunaraðferðarinnar, ii) lágmarksskrá yfir viðmiðunariðefni sem valin eru úr þeim iðefnum sem voru notuð til að sýna fram á ásætlanlegt nothæfi fullgiltu prófunaraðferðarinnar og iii) gildi fyrir nákvæmni og áreiðanleika sem svara til þeirra sem fengust með fullgiltu prófunaraðferðinni og sem eiga að fást með tillögðu prófunaraðferðinni þegar hún er metin út frá lágmarksskránni yfir viðmiðunariðefni (14).

Eignarréttarvarin prófunaraðferð: Prófunaraðferð sem hefur takmarkaða framleiðslu og dreifingu vegna einkaleyfa, höfundarréttar, vörumerkja o.s.frv.

Gæðatrygging: Stjórnunarferli sem felur í sér að aðilar, sem eru óháðir þeim sem framkvæma prófunina, meta fylgni við prófunarstaðla rannsóknarstofunnar, kröfur og tilhögun skráningar og áreiðanleika gagnaflutninga.

Viðmiðunariðefni: Íðefni sem eru valin til notkunar í fullgildingarferlinu og hafa þekkta svörun í viðmiðunarprófunarkerfinu, í glasi eða í lífi, eða í dýrategundunum sem miðað er við. Þessi iðefni skulu vera dæmigerð fyrir iðefnaflokkana, sem fyrirhugað er að nota prófunaraðferðina á, og dæmigerð fyrir allt svörunarsviðið, sem búast má við fyrir iðefnin sem eru prófuð með aðferðinni, frá mikilli, til lítillar og til neikvæðrar svörunar. Nauðsynlegt getur verið að nota mismunandi sett af viðmiðunariðefnum fyrir mismunandi stig fullgildingarferlisins og fyrir mismunandi prófunaraðferðir og mismunandi notkun prófunar (14. heimild).

Gildi (e. relevance): Lýsing á sambandi prófunarinnar og áhrifanna, sem miðað er við, og hvort sambandið hefur merkingu og er gagnlegt miðað við tiltekinn tilgang. Gildið lýsir því að hvaða marki prófunin nær að mæla rétt eða spá fyrir um líffræðilegu áhrifin sem miðað er við. Gildi felur í sér umfjöllun um nákvæmni (samsvörun) prófunaraðferðar (14. heimild).

Áreiðanleiki: Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma prófunaraðferð með samanburðarnákvæmni hjá hverri rannsóknarstofu og hjá mismunandi rannsóknarstofum í tiltekinn tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Áreiðanleiki er metinn með því að reikna út einsetursamanburðarnákvæmni og fjölsetra samanburðarnákvæmni (14. heimild).

Húðnæming: Ónæmisfræðilegt ferli sem er afleiðing þess að næmur einstaklingur verður fyrir staðbundnum váhrifum frá iðefni sem er ofnæmisvaldur og framkallar ónæmissvörun í húð sem getur leitt til þróunar næmingar við snertingu.

Örvunarstuðull: Gildi til að meta húðnæmingarmátt prófunarefnis sem er reiknað út sem hlutfall á milli fjölgunar í meðhöndluðum hópum og samskeiða samanburðarhópi sem fær eingöngu burðarefni.

Prófunarefni (einnig kallað prófunariðefni): Sérhvert efni og blanda sem eru prófuð með þessari prófunaraðferð.

Fullgilt prófunaraðferð: Prófunaraðferð sem búið er að ljúka fullgildingarrannsóknum fyrir til að ákvarða gildi hennar (þ.m.t. nákvæmni) og áreiðanleika í tilteknum tilgangi. Mikilvægt er að taka mið af því að fullgilt prófunaraðferð er e.t.v. ekki nægilega nothæf, með tilliti til nákvæmni og áreiðanleika, til að teljast samþykktarhæf fyrir fyrirhugaðan tilgang (14. heimild).“

2. Í stað kafla B.46 komi eftirfarandi:

„B.46 RANNSÓKN Í GLASI Á HÚÐERTINGU: PRÓFUNARAÐFERÐ MEÐ ENDURGERÐRI HÚÐÞEKJU MANNNS

INNGANGUR

1. Húðerting er skemmd í húð sem kemur fram eftir að prófunarefnið hefur verið á húðinni í allt að 4 klukkustundir og getur gengið til baka (eins og skilgreint er í hnattsamræmdu kerfi Sameinuðu þjóðanna (SP) til flokkunar og merkingar á iðefnum (HSK)) (e. *United Nations (UN) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, GHS*) og reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1272/2008 frá 16. desember 2008 um flokkun, merkingu og þökkun efna og blandna (1. og 3. heimild). Þessi prófunaraðferð er aðferð í glasi sem hægt er að nota til hættugreiningar á ertandi iðefnum (efnum og blöndum) í samræmi við 2. undirflokk HSK SP og reglugerð EB nr. 1272/2008 (1.–3. heimild). Innan ESB, og á öðrum svæðum sem hafa ekki samþykkt hinn valkvæða 3. undirflokk HSK SP (vægt húðertandi efni), er einnig hægt að greina óflokkuð (e. *non-classified*) iðefni með þessari prófunaraðferð, þ.e. sem utan flokka (e. *No Category*) í HSK SP og í reglugerð (EB) nr. 1272/2008 (1. og 3. heimild). Nota má þessa prófunaraðferð til að ákvarða húðertingu iðefna sem sjálfstæða staðgönguprófun (e. *replacement test*) á húðertingu í lífi innan stigskiptrar prófunaráætlanar (4. heimild og kafli B.4 í þessum viðauka).

2. Mat á húðertingu felur að jafnaði í sér notkun tilraunadýra (OECD-viðmiðunarregla 404 um prófanir, kafli B.4 í þessum viðauka) (4. heimild). Kafli B.4 var endurskodaður árið 2004, með tilliti til velferðar dýra, til að gera það kleift að ákvarða húðætingu/húðertingu með stigskiptri prófunaráætlun með fullgiltum prófunaraðferðum í glasi eða utan lífs og koma þannig í veg fyrir sársauka og þjáningu dýra. Búið er að samþykka þrjár fullgiltar prófunaraðferðir í glasi sem OECD-viðmiðunarreglur 430, 431 og 435 um prófanir (5.–7. heimild), og tvær þeirra sem kaffa B.40 og B.40a í þessum viðauka, til að nota í ætingarhluta stigskiptu prófunaráætlunarinnar í B.4 eða OECD-viðmiðunarreglu 404 um prófanir (4. heimild).
3. Þessi prófunaraðferð varðar húðertingu sem endapunktur með tilliti til heilbrigðis manna. Hún byggist á endurgerðri húðþekju manns (e. *reconstructed human epidermis model* (RHE)) en heildarhönnun hennar (notkun óummyndaðrar hrynifrumna manns sem frumugjafa og notkun á dæmigerðum vef og frumuuppbyggingu) líkir nákvæmlega eftir lífefnafræðilegum og lífeðlisfræðilegum eiginleikum efri hluta mannhúðar, þ.e. húðþekjunnar. Í þessari prófunaraðferð eru einnig nothæfisstaðlar (2. viðbætur) til að meta samsvarandi og breyttar aðferðir, byggðar á endurgerðri húðþekju manns, sem Evrópumíðstöð um fullgildingu staðgönguaðferða hefur þróað (EC-ECVAM) (8. heimild) í samræmi við meginreglur leiðbeiningarskjals Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 34 (9. heimild).
4. Til eru þrjár fullgiltar aðferðir sem fylgja þessari prófunaraðferð. Rannsóknunum á forfullgildingu, bestun og fullgildingu er lokið fyrir aðferð í glasi (10.–20. heimild) sem notar líkan með endurgerðri húðþekju manns (e. *RhE model*) sem fæst á almennum markaði undir heitinu EpiSkin™ (einnig nefnd fullgilta tilvísunaraðferðin (e. *Validated Reference Method – VRM*)). Tvær aðrar aðferðir við prófun á húðertingu, þar sem notað er líkan af endurgerðri húðþekju manns og sem fást á almennum markaði, hafa sýnt samsvarandi niðurstöður og fullgilta tilvísunaraðferðin, samkvæmt fullgildingu byggðri á nothæfisstöðlum (21. heimild), og þær eru EpiDerm™ SIT (EPI-200) og SkinEthic™ aðferðirnar með endurgerðri húðþekju manns (22).
5. Áður en hægt er að nota breytta eða samsvarandi aðferð í glasi með endurgerðri húðþekju manns í eftirlitsskyni, aðrar en fullgiltu tilvísunaraðferðina, EpiDerm™ SIT (EPI-200) eða SkinEthic™ RHE, skal ákvarða áreiðanleika hennar, gildi (nákvæmni) og takmarkanir miðað við tillagða notkun til þess að tryggja að hægt sé að líta á þær sem samsvarandi fullgiltu tilvísunaraðferðinni, í samræmi við kröfurnar í nothæfisstöðlunum sem eru tilgreindir í þessari prófunaraðferð (2. viðbætur). Auk þess er mælt með því að hafa bakgrunn- og skýringarskjal Efnahags- og framfarastofnunarinnar um prófanir á húðertingu í glasi (e. *OECD Explanatory Background Document on in vitro skin irritation testing*) til hliðsjónar áður en samsvarandi eða breytt aðferð í glasi með endurgerðri húðþekju manns er prúuð og fullgilt og lögð fram til samþykkis hjá stjórnvöldum (23. heimild).

SKILGREININGAR

6. Skilgreiningar, sem eru notaðar, eru gefnar upp í 1. viðbæti.

ATRÍÐI, SEM ÞARF AÐ HAGA Í HUGA Í UPPHAFI, OG TAKMARKANIR

7. Sú takmörkun er á prófunaraðferðinni, eins og sýnt er fram á í fullgildingarrannsókninni (16. heimild), að hún gefur ekki færi á flokkun íðefna í valkvæðan 3. undirflokk hnattsamræmds kerfis SP (vægt ertandi efni) (1. heimild). Ef aðferðin er notuð sem staðgönguprófun að hluta til getur verið nauðsynlegt að fylgja henni eftir með prófun í lífi til að lýsa að fullu ertingarmættinum (4. heimild og kafli B.4 í þessum viðauka). Viðurkennt er að notkun mannhúðar er með fyrirvara um siðferðilega þætti og skilyrði á lands- og alþjóðavísu.
8. Í þessari prófunaraðferð er fjallað um húðertingarþáttinn í glasi í stigskiptu prófunaráætluninni í kaffa B.4 (OECD-viðmiðunarregla 404 um prófanir) fyrir húðætingu eða húðertingu (4. heimild). Þó að þessi prófunaraðferð veiti ekki fullnægjandi upplýsingar um húðætingu skal það tekið fram að B.40a (OECD-viðmiðunarregla 431 um prófanir) um húðætingu byggist á sama prófunarkerfi með endurgerðri húðþekju manns þótt notuð sé önnur aðferðarlýsing (kafli B.40a). Þessi aðferð er byggð á líkönum með endurgerðri húðþekju manns sem í eru notaðar hrynifrumur manns og eru því dæmigerð, í glasi, fyrir marklíffæri dýrategundarinnar sem miðað er við. Auk þess nær hún yfir upphafsstig keðjuverkunar eða gangvirki bólgunnar (frumuskemmdir og vefjaskemmdir sem leiða af sér staðbundinn skaða) sem verður meðan á ertingu í lífi stendur. Margvísleg efni hafa verið prófuð við fullgildinguna, sem liggur til grundvallar þessari prófunaraðferð, og gagnasafn fullgildingarrannsóknarinnar, byggt á athugunum, náði yfir alls 58 íðefni (16., 18. og 23. heimild). Þetta á við um föst efni, vökva, hálfstöð efni og vax. Vökvarnir mega vera vatnskenndir eða ekki vatnskenndir og föstu efnin mega vera uppleysanleg eða óleysanleg í vatni. Föstu efnin skulu möluð í fint duft áður en þau eru borin á, ef þess er nokkur kostur, en engin önnur formedhöndlung á sýninu er nauðsynleg. Ekki er enn búið að meta lofttegundir og úðaefni í fullgildingarrannsókn (24. heimild). Þó að það sé hugsanlegt að hægt sé að prófa lofttegundir og úðaefni með tækninni sem notar endurgerða húðþekju manns er ekki hægt að prófa þau með núverandi prófunaraðferð. Einnig skal gefa því gaum að mikið lituð íðefni geta haft áhrif á mælingar á lífvænleika frumna og því verið þörf á aðlöguðum samanburði til leiðréttingar (sjá 24.–26. mgr.).
9. Stök prófunarkeyrsla (e. *testing run*) á þremur samhliða vefjasýnum ætti að nægja ef flokkun prófunarefnisins er ótvíræð. Ef niðurstöður eru óvissar, t.d. ef ósamsvörum er í samhliða mælingum og/eða meðalhundradshluti lífvænleika er jafn $50 \pm 5\%$, skal tekið til athugunar að gera aðra keyrslu, sem og þá þriðju ef ósamræmi er á milli niðurstaðna úr fyrstu keyrslunum tveimur.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

10. Prófunarefnið er borið staðbundið á þrívítt líkan með endurgerðri húðþekju manns sem samanstandur af óumbreyttum hrynifrumum manns sem hafa verið ræktaðar til að mynda marglaga, mjög aðgreint líkan af húðþekju manns. Líkanið samanstandur af grunn-, þymi- og kornalagi og marglaga hornlagi sem í eru, milli frumna, fitulagaþynnur sem eru dæmigerðar fyrir helstu flokka lípiða, hliðstæðum þeim sem finnast í lífi.

11. Húðerting af völdum íðefna, sem kemur fram sem hörundsroði og bjúgur, er afleiðing keðjuverkandi atburða sem hefjast þegar efni fer í gegnum hornlag húðar og veldur skaða á undirliggjandi lögum hýrnisfrumna. Deyjandi hýrnisfrumur láta frá sér milliliði (e. *mediators*) sem hefja keðjuverkun bólgu sem hefur áhrif á frumurnar í leðurhúðinni, einkum frumurnar í uppistöðuvef og innþekju. Það er útvíkkun og aukid gegndræpi frumanna í innþekjunni sem framkallar hörundsroðann og bjúginn. Upphafsatburðir keðjuverkunarinnar eru mældir með aðferðum sem byggjast á endurgerðri húðþekju.
12. Lífvænleiki frumna í líkönum með endurgerðri húðþekju manns er mældur með umbreytingu með ensimum á líffitnum MTT (3-(4,5-dímetylþíasól-2-yl)-2,5-dífenyltetrasólíumbrómíð, þíasólýl-blár) CAS-nr. 298-93-1)) í blátt formasansalt sem er mælt meginlega eftir útdrátt úr vefjunum (25. heimild). Ertandi íðefni eru greind eftir hæfni þeirra til að minnka lífvænleika frumna niður fyrir skilgreind viðmiðunargildi (þ.e. $\leq 50\%$ fyrir 2. undirflokk HSK SP eða reglugerðar (EB) nr. 1272/2008). Íðefni, sem framkalla lífvænleika í frumum sem er meiri en skilgreint viðmiðunargildi, má líta á sem efni sem eru ekki ertandi (þ.e. $> 50\%$ utan flokka), eftir því í hvaða regluramma niðurstöðurnar, sem fást með þessari prófunaraðferð, eru notaðar.

SÝNT FRAM Á HÆFNI

13. Áður en einhver af fullgiltu aðferðunum þremur, sem fylgja þessari prófunaraðferð, er tekin til notkunar að staðaldri skulu rannsóknarstofur staðfesta tæknilega hæfni sína með ráðlögðu viðmiðunariðefnunum tíu í töflu 1. Samsvarandi aðferðir, sem eru þróaðar samkvæmt þessari prófunaraðferð, eða breytingar á einhverri af fullgiltu aðferðunum þremur þurfa að uppfylla kröfur um nothæfisstaðla, sem eru tilgreindar í 2. viðbæti við þessa prófunaraðferð, áður en þær eru notaðar til lögboðinna prófana.
14. Mælt er með því að notandinn sannprófi tálmaeiginleika (e. *barrier properties*) vefjanna eftir viðtöku þeirra, samkvæmt leiðbeiningum frá framleiðanda líkansins með endurgerðri húðþekju manns, til að sýna fram á hæfni. Þetta er sérstaklega mikilvægt ef vefirnir eru fluttir um langan veg eða flutningurinn tekur langan tíma. Þegar aðferðin hefur verið notuð á árangursríkan hátt og sýnt hefur verið fram á hæfni í notkun hennar þá er ekki nauðsynlegt að sannprófa hana að staðaldri. Ef aðferð er notuð að staðaldri er þó mælt með að því að haldið sé áfram að meta tálmaeiginleikana með reglulegu millibili.

Tafla 1

Viðmiðunariðefni ⁽¹⁾

Efni	CAS-nr.	Stig í lífi ⁽²⁾	Eðlisástand	Undirflokkur HSK SP eða reglugerðar (EB) nr. 1272/2008
naftalínedíksýra	86-87-3	0	Fast efni	Utan flokka
ísóprópanól	67-63-0	0,3	Vökvi	Utan flokka
metýlsterat	112-61-8	1	Fast efni	Utan flokka
heptýlbútýrat	5870-93-9	1,7	Vökvi	Utan flokka (Valkvæður 3. undirflokkur ⁽³⁾ , ⁽⁴⁾)
hexýlsalisýlat	6259-76-3	2	Vökvi	Utan flokka (Valkvæður 3. undirflokkur ⁽³⁾ , ⁽⁴⁾)
sýklamenaldehyð	103-95-7	2,3	Vökvi	Undirflokkur 2
1-brómhexan	111-25-1	2,7	Vökvi	Undirflokkur 2
kalíumhýdroxíð (5% vatnslausn)	1310-58-3	3	Vökvi	Undirflokkur 2
1-metýl-3-fenýl-1-píperasín	5271-27-2	3,3	Fast efni	Undirflokkur 2
Heptanal	111-71-7	3,4	Vökvi	Undirflokkur 2

⁽¹⁾ Þessi viðmiðunariðefni eru hluti af viðmiðunariðefnunum sem voru notuð í fullgildingarrannsókninni.

⁽²⁾ Stig í lífi í samræmi við kafla B.4 og OECD-viðmiðunareglu 404 um prófanir (4. heimild).

⁽³⁾ Í þessari prófunaraðferð er litið á hinn valkvæða 3. undirflokk HSK SP (vægt ertandi efni) (1. heimild) sem utan flokka.

⁽⁴⁾ Hinn valkvæði 3. undirflokkur HSK SP á ekki við samkvæmt reglugerð (EB) nr. 1272/2008.

VINNUAÐFERÐ

15. Eftirfarandi er lýsing á þáttum og tilhögun prófunaraðferðar með endurgerðri húðþekju manns til að meta húðertingu. Líkan með endurgerðri húðþekju manns er sett upp og má útbúa það innan rannsóknarstofunnar eða kaupa það. Tiltækar eru staðlaðar verklagsreglur fyrir EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200) og SkinEthic™ RHE (26.–28. heimild). Prófanir skulu fara fram samkvæmt eftirfarandi:

Þættir í prófunaraðferð með endurgerðri húðþekju manns*Almennar aðstæður*

16. Nota skal óumbreyttar hrynifrumur manns til að endurgera þekjuna. Í henni skulu vera mörg lög af lífvænlegum þekjufrumum (grunnlag, þyrnilag, kornalag) undir virku hornlagi. Hornlagið skal vera marglaga, með grundvallarfritusniði til að veita virkan, traustan tálma gegn því að frumudrepani markefni, t.d. natriumdódekýlsúlfat eða Triton X-100, gangi hratt inn í það. Sýna skal fram á tálmaþvirkna og hana má meta, annaðhvort með því að ákvarða við hvaða styrk markefni dregur úr lífvænleika vefjanna um 50% (IC₅₀) eftir fastan váhrifatíma eða með því að ákvarða hve langan váhrifatíma þarf til að draga úr lífvænleika frumna um 50% (ET₅₀) þegar markefnið er borið á í tilteknum, föstum styrk. Afmörkunareiginleikar líkansins skulu koma í veg fyrir að efni flytjist um hornlagið að lífvænlegum vef en það myndi skerða getu líkansins með endurgerðri húðþekju manns til að lýsa váhrifum á húð. Líkanið með endurgerðri húðþekju manns skal vera laust við smit af völdum bakteria, veira, berfryminga eða sveppa.

Virkniaðstæður

Lífvænleiki

17. Greiningin, sem er notuð til að ákvarða umfang lífvænleika, er greining með MTT-lit (25. heimild). Notendur líkans með endurgerðri húðþekju manns skulu ganga úr skugga um að hver framleiðslulota líkana, sem eru notuð, uppfylli skilgreindar viðmiðanir fyrir neikvæðan samanburð. Ljósþéttni hreins útdráttarleysis skal vera nægilega lítil, þ.e. < 0,1. Ásættanlegt svið (efri og neðri mörk) ljósþéttignilda neikvæða samanburðarins (við aðstæður samkvæmt prófunaraðferðinni fyrir húðertingu) eru ákvörðuð af hönnuði eða birgi líkansins með endurgerðri húðþekju manns og ásættanlegt svið fullgiltu aðferðanna þriggja eru gefin í töflu 2. Skjalfest skal að vefirnir, sem eru meðhöndlaðir með neikvæðu samanburðarefni, séu stöðugir í ræktun (veiti samsvarandi niðurstöður við lífvænleikamælingar meðan váhrifatímabil prófunarinnar stendur yfir.

Tafla 2

Ásættanlegt svið ljósþéttignilda neikvæðs samanburðar

	Neðri ásættanleikamörk	Efri ásættanleikamörk
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic™ RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Tálmaþvirkni

18. Hornlagið og samsetning lípíðanna í því ætti að nægja til að koma í veg fyrir að frumudrepani markefni, t.d. natriumdódekýlsúlfat eða Triton X-100, gangi hratt inn í það, miðað við IC₅₀ eða ET₅₀.

Formfræði

19. Gera skal vefjafræðilega rannsókn á líkaninu með endurgerðu húðþekjunni til að sýna fram á að bygging hennar sé lík húðþekju af manni (þ.m.t. marglaga hornlag).

Samanburðarnákvæmni

20. Niðurstöður um jákvæða samanburðaríðefnið og úr neikvæðum samanburði skulu sýna fram á samanburðarnákvæmni í langan tíma.

Gæðæftirlit

21. Hönnuður eða birgir líkansins með endurgerðri húðþekju manns skal sjá til þess og sýna fram á að hver framleiðslulota líkana, sem er notuð, uppfylli skilgreindar viðmiðanir fyrir afhendingu framleiðslunnar (e. *production release criteria*) en af þeim skipta lífvænleiki (17. mgr.), tálmaþvirkni (18. mgr.) og formfræði (19. mgr.) mestu máli. Notendur aðferðarinnar skulu fá gögn um þau atriði afhent svo þeir geti haft þær upplýsingar með í prófunarskýrslunni. Hönnuður eða birgir líkansins með endurgerðri húðþekju manns (eða rannsakandi ef notað er innanhússlíkan) skal staðfesta ásættanlegt svið (efri og neðri mörk) fyrir IC₅₀ eða ET₅₀. Aðeins er hægt að samþykka niðurstöður, sem fást með viðurkenndum vefjum, sem áreiðanlegar til að spá fyrir um ertingarflokkun. Dæmi um ásættanlegt svið fyrir fullgiltu aðferðirnar þrjár eru gefin í töflu 3.

Tafla 3

Dæmi um gæðæftirlitsviðmiðanir fyrir afhendingu framleiðslulota

	Neðri ásættanleikamörk	Efri ásættanleikamörk
EpiSkin™ (SM) 18 klukkustunda meðhöndlun með natríumdódekýlsúlfati (26. heimild).	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1% Triton X-100) (27. heimild)	ET ₅₀ = 4,8 klst.	ET ₅₀ = 8,7 klst.
SkinEthiC™ RHE 1% Triton X-100) (28. heimild)	ET ₅₀ = 4,0 klst.	ET ₅₀ = 9,0 klst.

Prófunar- og samanburðarefni borin á

22. Nota skal a.m.k. þrjú samhlíða sýni fyrir hvert prófunariðefni og fyrir samanburðinn í hverri keyrslu. Nota skal nægilegt magn prófunarefnisins, bæði þegar um er að ræða vökva og föst iðefni, til að þekja yfirborð húðþekjunnar jafnt en þó ekki ótakmarkaðan skammt, þ.e. nota skal minnst 25 µl/cm² eða 25 mg/cm². Ef um er að ræða fast efni skal væta yfirborð húðþekjunnar með afjönuðu eða eimuðu vatni áður en efnið er borið á til að tryggja góða snertingu prófunariðfnisins við yfirborð húðþekjunnar. Prófa skal föst efni í fingerðu duftformi þegar því verður við komið. Í lok váhrifátímans skal skola prófunarefnið vandlega af yfirborði húðþekjunnar með vatnskenndri jafnalausn eða 0,9% NaCl. Váhrifátímabilið varir í 15–60 mínútur, eftir því hver af fullgiltu aðferðunum þremur er notuð, og sýnið er látið standa við hitastigið milli 20–37 °C. Þessi váhrifátímabil og hitastig eru bestuð fyrir hverja aðferð með líkani með endurgerðri húðþekju manns og eru dæmigerð fyrir mismunandi eðliseiginleika aðferðanna. Nánari upplýsingar er að finna í stöðluðum verklagsreglum fyrir aðferðirnar (26.–28. heimild).
23. Nota skal samskeiða, neikvæðan og jákvæðan samanburð í hverri keyrslu til að sýna fram á að lífvænleiki (með neikvæða samanburðinum), tálmaþvirkni og næmi vefjanna, sem af henni leiðir (með jákvæða samanburðinum), séu innan skilgreinds, rannsóknarsögulegs ásættanleikasviðs. Lagt er til að notað sé 5% natríumdódekýlsúlfat í vatnslausn við jákvæðan samanburð. Lagt er til að notað sé vatn eða fóstfatjöfnuð saltlausn við neikvæðan samanburð.

Mælingar á lífvænleika frumna

24. Mikilvægasti þáttur prófunarferlisins er að lífvænleikinn sé ekki mældur um leið og prófunarefnið hafa verið borin á heldur eftir að skolaður vefurinn hefur verið látinn standa í hæfilega langan tíma í nýju æti eftir meðhöndlunina. Á þeim tíma nær vefurinn bæði að jafna sig af vægt frumudrepanði áhrifum og greinileg, frumudrepanði áhrif koma í ljós. Við bestun prófunarinnar (11.–15. heimild) kom í ljós að best reyndist ef stöðutíminn (e. *incubation period*) eftir meðhöndlun var 42 klukkustundir.
25. Greining með MTT-lit er fullgilt, megindleg aðferð sem skal nota til að mæla lífvænleika frumna í þessari prófunaraðferð. Hún samræmist notkun í þrívíðu vefjalíkani. Vefjasýnið er sett í MTT-litarlausn í hæfilegum styrk (t.d. 0,3–1 mg/ml) í 3 klukkustundir. Útfellt, blátt formasan er svo dregið út úr vefnum með leysi (t.d. isóprópanóli, síru isóprópanóli) og formasanstyrkurinn er mældur með því að ákvarða ljósbéttni við 570 nm á síukvarðabili sem er að hámarki ± 30 nm.
26. Ljósfræðilegir eiginleikar prófunarefnisins eða efnræn verkun þess á MTT-litinn getur truflað greininguna og leitt til rangs mats á lífvænleika (af því að prófunarefnið getur komið í veg fyrir litarmyndunina eða snúið henni við en getur einnig valdið henni). Þetta getur gerst þegar tiltekið prófunariðefni er ekki skolað algerlega af vefnum eða ef það gengur inn í húðþekjuna. Ef prófunariðefni hefur beina virkni á MTT-litinn (skerðir virkni MTT-litarins), er lítað frá náttúrunnar hendi eða litast við meðhöndlun vefjarins skal viðbótarsamanburði beitt til að greina og leiðrétta truflandi áhrif prófunariðfnisins á aðferðina sem er notuð til mælinga á lífvænleika. Í stöðluðu verklagsreglunum fyrir fullgiltu aðferðirnar þrjár (26.–28. heimild) er ítarleg lýsing á því hvernig unnt er að leiðrétta beina virkniskerðingu MTT-litarins og truflanir frá litarefnum.

Viðmiðanir fyrir ásættanleika

27. Fyrir hverja aðferð með gildum framleiðslulutum líkana með endurgerðri húðþekju manns (sjá 21 mgr.) skal ljóspéttni vefja, sem hafa verið meðhöndlaðir með neikvæða samanburðinum, endurspegla gæði vefjanna sem hafa farið gegnum öll skref sendingar- og viðtökuflerlisins og alla meðhöndlun samkvæmt aðferðarlýsingu. Ljóspéttnigildi samanburðarins skulu ekki vera undir viðurkenndum, rannsóknarsögulegum mörkum. Á sama hátt skulu vefir, sem eru meðhöndlaðir með jákvæða samanburðinum, þ.e. 5% natríumdódekýlsúlfati í vatnslausn, endurspegla getu þeirra til að bregðast við ertandi íðefnum við aðstæður prófunaraðferðarinnar (26.–28. heimild). Tengdar og viðeigandi mælingar á breytileika milli samhliða vefjasýna skulu skilgreindar (t.d. ef notuð eru staðalfrávik skulu þau vera innan einhliða 95% vikmarka sem eru reiknuð út frá rannsóknarsögulegum gögnum og skal staðalfrávik fullgiltu tilvísunaraðferðarinnar vera < 18%).

Túlkun á niðurstöðum og spálíkan

28. Nota má ljóspéttnigildin, sem fást með hverju prófunariðefni, til að reikna út lífvænleika í hundraðshlutum, staðlaðan við neikvæða samanburðinn sem er látinn gilda 100%. Þröskuldsgildi hundraðshluta lífvænleika frumna, sem skilur á milli ertandi íðefna og óflokkaðra prófunariðefna, og sú tölfræðilega aðferð eða aðferðir, sem eru notaðar til að meta niðurstöðurnar og greina ertandi íðefni, skulu skýrt skilgreind og skjalfest og sýna skal fram á að þau séu eins og við á. Þröskuldsgildi til að spá fyrir um ertandi áhrif eru gefin hér á eftir:
- Prófunariðefnið er talið ertandi fyrir húð, í samræmi við 2. undirflokk HSK SP eða reglugerðar (EB) nr. 1272/2008, ef lífvænleiki vefjar eftir váhrif og stöðutímann að lokinni meðhöndlun er minni en eða jafn (\leq) 50%.
 - Háð reglurammanum utan um notkun niðurstaðnanna, sem fást með þessari prófunaraðferð, má líta svo á að prófunariðefnið sé ekki ertandi fyrir húð, í samræmi við flokkun sem utan flokka í HSK SP eða reglugerð (EB) nr. 1272/2008, ef lífvænleiki vefjanna eftir váhrif og stöðutímann að lokinni meðhöndlun er meiri en (>) 50%.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Gögn

29. Setja skal gögn fyrir samhliða vefjasýni innan hvernar keyrslu (t.d. ljóspéttnigildi og gögn um reiknaðan hundraðshluta fyrir lífvænleika frumna fyrir hvert prófunariðefni, auk flokkunar) fram í töflu, þ.m.t. gögn úr endurteknum tilraunum, ef við á. Auk þess skal tilgreina meðaltal \pm staðalfrávik fyrir hverja keyrslu. Víxlverkanir við MTT-hvarfmiðil og lituð prófunariðefni skulu tilgreindar fyrir hvert prófað íðefni.

Prófunarskýrsla

30. Prófunarskýrslan skal innihalda eftirfarandi upplýsingar:

Prófunar- og samanburðariðefni:

- efnaheiti s.s. CAS-heiti og CAS-númer og EB-heiti og EB-númer, ef þekkt,
- hreinleiki og samsetning íðefnisins (í hundraðshlutum miðað við þyngd),
- eðlisfræðilegir eða efnafræðilegir eiginleikar sem tengjast framkvæmd rannsóknarinnar (t.d. eðlisástand, stöðugleiki, rokgirni, pH-gildi og vatnsleysni, ef þekkt),
- meðhöndlun prófunar- og samanburðariðefnanna fyrir prófunina, ef við á (t.d. hitun, mölun),
- geymsluskilyrði.

Rökstuðningur fyrir vali á líkaninu með endurgerðri húðþekju manns og aðferðarlýsingunni sem eru notuð.

Prófunaraðstæður:

- frumkerfið sem er notað,
- heildarupplýsingar til stuðnings notkunar á tilteknu líkani með endurgerðri húðþekju manns, þ.m.t. nothæfi líkansins. Í þeim skal eftirfarandi felast án þess þó að einskorðast við það:
 - i. lífvænleiki
 - ii. tálmaþingni
 - iii. formfræði
 - iv. samanburðarnákvæmni og forspágeta
 - v. gæðaeftirlit vegna líkansins
- upplýsingar um prófunarferlið sem er notað,
- prófunarskammtarnir sem voru notaðir, váhrifatími og stöðutíminn að lokinni meðhöndlun,
- lýsingar á öllum breytingum á prófunaraðferðinni,

- tilvísanir í rannsóknarsöguleg gögn um líkanið. Í þeim skal eftirfarandi felast án þess þó að einskorðast við það:
 - i. ásættanleiki gæðaeftirlitsgagna með tilvisun í rannsóknarsöguleg gögn um framleiðslulotur,
 - ii. ásættanleiki gilda jákvæða og neikvæða samanburðarins, með tilvisun í meðalgildi og gildissvið jákvæða og neikvæða samanburðarins,
- lýsing á viðmiðunum fyrir matinu sem var notað, auk rökstuðnings fyrir vali á lokunarpunkti eða lokunarpunktum fyrir spálíkanið,
- tilvísanir í rannsóknarsöguleg gögn.

Niðurstöður:

- gögn um hvert prófunariðefni fyrir hverja keyrslu og hverja samhliða mælingu í töfluformi,
- tilgreining á samanburðinum sem var notaður fyrir íðefni, sem skerða beint virkni MTT-litar, og/eða litandi prófunariðefni,
- lýsing á öðrum áhrifum sem fram komu.

Umfjöllun um niðurstöðurnar.

Niðurstaða

HEIMILDIR

- 1) UN (2009), United Nations Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, UN New York and Geneva. Aðgengilegt á: [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. Aðgengilegt á: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- 3) Reglugerð (EB) nr. 1272/2008 frá 16. desember 2008 um flokkun, merkingu og þökkun efna og blandna, um breytingu og niðurfellingu á tilskipunum 67/548/EBE og 1999/45/EB og um breytingu á reglugerð (EB) nr. 1907/2006. Stjtið. EB L 353, 31.12.2008, bls. 1
- 4) OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 404, OECD, Paris. Aðgengilegt á: [<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. Aðgengilegt á: [<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. Aðgengilegt á: [<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. Aðgengilegt á: [<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)? Aðgengilegt á: [<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. Aðgengilegt á: [<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 . Aðgengilegt á: [<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. Aðgengilegt á: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- 21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Aðgengilegt á: [<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. Aðgengilegt á: [<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. Aðgengilegt á: [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. Aðgengilegt á: [<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). Aðgengilegt á: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- 28) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42a test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Aðgengilegt á: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- 29) Harvell, J.D., Lamminstausta, 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) Tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 2001/59/EB frá 6. ágúst 2001 um tuttugustu og áttundu aðlögun að tækniframförum á tilskipun ráðsins 67/548/EBE um samræmingu ákvæða í lögum og stjórnsýslufyrirmælum um flokkun, þökkun og merkingu hættulegra efna (Stjtið. EB L 225, 21.8.2001, bls. 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 Kandárova, 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.

1. viðbætur

Skilgreiningar

Nákvæmni: Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktu viðmiðunargildi niðurstaða úr prófun er. Nákvæmni er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferða og einn þáttur gildis (e. *relevance*). Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli réttra niðurstaðna úr prófunaraðferð (9. heimild).

Lífvænleiki frumna: Mæliþáttur sem mælir heildarvirgni frumuhóps, t.d. getu frumubundinna vetnissvipta í hvatberum til að draga úr líflitnum MTT (3-(4,5-dímetylþíasól-2-ýl)-2,5-dífenýltetrasólíumbromíð, þíasólýl-blár) sem, háð endapunktinum sem mældur er og tilhögun prófunar, samsvarar heildartölu og/eða lífsþrótti lifandi frumna.

Samsvörun: Samsvörun er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferðar, þegar um er að ræða prófunaraðferðir sem gefa afdráttarlausar niðurstöður, og er einn þáttur gildis. Hugtakið er notað í stað hugtaksins „nákvæmni“ og er skilgreint sem hlutfall allra prófaðra íðefna sem eru rétt flokkuð sem jákvæð eða neikvæð. (9)

ET₅₀: Hægt að meta með ákvörðun á þeim váhrifátíma sem þarf til að draga úr lífvænleika frumu um 50% við notkun markíðefnis við tilgreindan, fastan styrk, sjá einnig IC₅₀.

Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1272/2008 frá 16. desember 2008 um flokkun, merkingu og þökkun efna og blandna: Hríndir í framkvæmd hnattsamræmdu kerfi SP til flokkunar og merkingar íðefna (efna og blandna) innan Evrópusambandsins (3. heimild).

HSK (hnattsamræmt kerfi Sameinuðu þjóðanna (SP) til flokkunar og merkingar íðefna): Kerfi til flokkunar íðefna (efna og blandna), samkvæmt stöðluðum tegundum og stigum eðlisrænnar hættu, heilbrigðishættu og umhverfshættu, sem tekur til samsvarandi hættubodsatriða, s.s. skýringarmynda, viðvörunarorða, hættusetninga, varnaðarsetninga og öryggisblaða til að miðla upplýsingum um skaðleg áhrif þeirra til verndar fólki (þ.m.t. vinnuveitendum, launafólki, flytjendum, neytendum og bráðaliðum) og umhverfinu (1. heimild).

IC₅₀: Hægt að meta með ákvörðun á þeim styrk markíðefnis sem dregur úr lífvænleika vefjanna um 50% (IC₅₀) eftir fastan váhrifátíma, sjá einnig ET₅₀.

Ótakmarkaður skammtur: Það magn prófunariðefnis sem er borið á húðþekjuna og er umfram magnið sem þarf til að hylja yfirborð húðþekjunnar fullkomlega og jafnt.

Hliðstæð prófun (e. Me-too test): Heiti úr talmáli á prófunaraðferð sem er sambærileg fullgiltum og samþykktum viðmiðunaraðferðum að skipulagi og virkni. Slík prófunaraðferð kæmi til greina við flýtifullgildingu (e. *catch-up validation*). Notað sem samheiti við „samsvarandi prófunaraðferð“ (9. heimild.)

Nothæfisstaðlar: Staðlar, byggðir á fullgilti prófunaraðferð, sem eru grundvöllur fyrir mat á samanburðarhæfi tillagðrar prófunaraðferðar sem er samsvarandi fullgiltu aðferðinni með tilliti til verkunarmáta og virkni. Meðal þeirra eru i) grundvallarþættir prófunaraðferðarinnar, ii) lágmarksskrá yfir viðmiðunariðefni sem valin eru úr þeim íðefnum sem voru notuð til að sýna fram á ásettannlegt nothæfi fullgiltu prófunaraðferðarinnar og iii) gildi fyrir nákvæmni og áreiðanleika sem eru samsvarandi þeim sem fengust með fullgiltu prófunaraðferðinni og sem eiga að fást með tillögðu prófunaraðferðinni þegar hún er metin út frá lágmarksskránni yfir viðmiðunariðefni (9. heimild).

Viðmiðunariðefni: Íðefni sem eru valin til notkunar í fullgildingarferlinu og hafa þekktasvörun í viðmiðunarprófunarkerfinu, í glasi eða í lífi, eða í dýrategundunum sem miðað er við. Þessi íðefni skulu vera dæmigerð fyrir íðefnaflokkana, sem fyrirhugað er að nota prófunaraðferðina á, og dæmigerð fyrir allt svörunarsviðið, sem búast má við fyrir íðefnin sem eru prófuð með aðferðinni, frá mikilli, til lítillar og til neikvæðrar svörunar. Nauðsynlegt getur verið að nota mismunandi sett af viðmiðunariðefnum fyrir mismunandi stig fullgildingarferlisins og fyrir mismunandi prófunaraðferðir og mismunandi notkun prófunar (9. heimild).

Gildi: Lýsing á sambandi prófunarinnar og áhrifanna, sem miðað er við, og hvort sambandið hefur merkingu og er gagnlegt miðað við tiltekinn tilgang. Gildið lýsir því að hvaða marki prófunin nær að mæla rétt eða spá fyrir um líffræðilegu áhrifin sem miðað er við. Gildi felur í sér umfjöllun um nákvæmni (samsvörun) prófunaraðferðar (9. heimild).

Áreiðanleiki: Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma prófunaraðferð með samanburðarnákvæmni hjá hverri rannsóknarstofu og hjá mismunandi rannsóknarstofum í tiltekinn tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Áreiðanleiki er metinn með því að reikna út einsetursamanburðarnákvæmni og fjölsetra samanburðarnákvæmni (9. heimild).

Staðgönguprófun: Prófun sem er hönnuð til að koma í stað prófunar, sem notuð er að staðaldri og samþykkt til hættugreiningar og/eða áhættumats, og sem hefur verið sýnt fram á að verndar heilbrigði manna eða dýra eða umhverfið, eftir því sem við á, til jafns við eða betur en samþykktá prófunin við allar hugsanlegar prófunaraðstæður og fyrir öll hugsanleg prófunariðefni.

Næmi: Hlutfall allra jákvæðra/virkra prófunarefna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Næmi er mælikvarði á nákvæmni prófunaraðferðar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunaraðferðar (9. heimild).

Húðerting: Framköllun á skemmd í húð sem getur gengið til baka og kemur fram eftir að prófunariðefnið hefur verið á húðinni í allt að 4 klukkustundir. Húðerting er staðbundin svörun, ekki ónæmisvaldandi, sem kemur í ljós stuttu eftir örvin (29. heimild). Aðaleinkenni hennar er að hún gengur til baka, veldur bólguviðbrögðum og flestum klínískum einkennum ertingar (hörundsroða, bjúg, kláða og sársauka) sem tengjast bólguferli.

Sértæki: Hlutfall allra neikvæðra/óvirkra prófunarefna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Sértæki er mælikvarði á nákvæmni prófunaraðferðar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunaraðferðar (9. heimild).

Stigskipt prófunaráætlun: Prófun sem notar prófunaraðferðir raðbundið þannig að prófunaraðferðir á hverju stigi eru valdar með tilliti til niðurstaðna á næsta prófunarstigi á undan (9. heimild).

Prófunariðefni (einnig nefnt prófunarefni): Sérhvert efni og blanda sem eru prófuð með þessari prófunaraðferð.

2. viðbætur

Nothæfisstaðlar fyrir mat á tillögðum, samsvarandi eða breyttum aðferðum til prófunar í glasi á húðertingu með endurgerðri húðþekju manns

INNGANGUR

1. Tilgangurinn með nothæfisstöðlum er að tilgreina á hvaða grundvelli hægt sé að ákvarða hvort nýjar aðferðir, bæði eignarréttarvarðar (þ.e. með höfundarrétti, vörumerki eða skráðar) og þær sem eru ekki eignarréttarvarðar, séu nægilega nákvæmar og áreiðanlegar miðað við tiltekinn tilgang með prófuninni. Nota má þessa nothæfisstaðla, sem byggjast á fullgiltum og samþykktum prófunaraðferðum, til að meta áreiðanleika og nákvæmni annarra hliðstæðra aðferða (hliðstæðra prófana) sem eru byggðar á samsvarandi vísindalegum meginreglum og sem mæla eða spá fyrir um sömu líffræðilegu áhrif eða eiturrif (9. heimild).
2. Áður en breyttar aðferðir, þ.e. tillagðar, hugsanlegar úrbætur á viðurkenndri prófunaraðferð, eru samþykktar skal fara fram mat til að ákvarða áhrif tillögðu breytinganna á nothæfi prófunarinnar og mat á því að hvaða marki breytingarnar hafa áhrif á fyrirliggjandi upplýsingar varðandi aðra þætti í fullgildingarferlinu. Háð fjölda og eðli tillögðu breytinganna, gagnanna, sem aflað hefur verið fyrir breytingarnar, og fylgiskjala til stuðnings breytingunum skulu þær annaðhvort fara í sama fullgildingarferli og lýst er fyrir nýja prófun eða, ef við á, takmarkað mat á áreiðanleika og gildi þar sem stuðst er við viðurkennda nothæfisstaðla (9. heimild).
3. Aðferðir, sem samsvara (eru hliðstæðar) eða eru breytingar á einhverjum hinna þriggja fullgiltu aðferða (EpiSkin™ (fullgilta tilvísunaraðferðin), EpiDerm™ SIT (EPI-200) og SkinEthic™ RHE) sem lagt er til að séu notaðar í þessari prófunaraðferð, skulu metnar með því að nota iðefni, sem eru dæmigerð fyrir allt svið *Draize*-ertingarstiganna, til að ákvarða áreiðanleika þeirra og nákvæmni. Ef þessar samsvarandi eða breyttu aðferðir, sem lagðar eru til, eru metnar með ráðlögðu viðmiðunariðefnunum 20 samkvæmt nothæfisstöðlunum (tafla 1) skulu gildin fyrir áreiðanleika þeirra og nákvæmni vera a.m.k. sambærileg gildunum, sem fást með fullgiltu tilvísunaraðferðinni (tafla 2) (2. og 16. heimild), eða hærri. Áreiðanleika- og nákvæmnisgildin, sem skulu fengin fram, eru lögð fram í 8.–12. mgr. í þessum viðbæti. Óflokkuð iðefni (utan flokka í HSK SP eða reglugerð (EB) nr. 1272/2008) og flokkuð iðefni (2. undirflokkur í HSK SP eða reglugerð (EB) nr. 1272/2008) (1. heimild), sem eru dæmigerð fyrir mismunandi iðefnaflokka, eru höfð með svo að hægt sé að bera áreiðanleika og nákvæmni (næmi, sértæki og heildarnákvæmni) tillögðu aðferðarinnar saman við sömu þætti í fullgiltu tilvísunaraðferðinni. Áður en aðferðin er notuð til prófunar á nýjum prófunariðefnum skal ákvarða áreiðanleika hennar sem og getu hennar til að greina rétt ertandi iðefni í 2. undirflokki samkvæmt HSK SP eða reglugerð (EB) nr. 1272/2008 og, háð reglurammanum sem gildir um niðurstöðurnar sem fást, einnig ákvarða getu hennar til að greina rétt utanflokkaíðefni samkvæmt HSK SP eða reglugerð (EB) nr. 1272/2008.

4. Þessir nothæfisstaðlar eru byggðir á nothæfisstöðlum Evrópumíðstöðvar um fullgildingu staðgönguáðferða (8. heimild) sem eru uppfærðir samkvæmt flokkunar- og merkingarkerfum HSK Sp og reglugerðar (EB) nr. 1272/2008 (1. og 3. heimild). Upprunalegu nothæfisstæðlarnir voru skilgreindir eftir að fullgildingarránsókninni lauk (21. heimild) og voru byggðir á flokkunarkerfi ESB eins og mælt er fyrir um í tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 2001/59/EB frá 6. ágúst 2001 um tuttugustu og áttundu aðlögun að tækni framföllum á tilskipun ráðsins 67/548/EBE um samræmingu ákvæða í lögum og stjórnsýslufyrirmælum um flokkun, þökkun og merkingu hættulegra efna⁵. Nothæfisstæðlarnir hafa verið uppfærðir vegna samþykkis fyrir flokkunar- og merkingarkerfi HSK Sp í Evrópusambandinu (reglugerð (EB) nr. 1272/2008) (3. heimild) sem átti sér stað eftir að fullgildingarránsókninni lauk og áður en þessi prófunaraðferð var fullgerð (8. heimild). Uppfærslan varðar helst breytingar i) á viðmiðunariðefnum vegna nothæfisstæðlanna og ii) skilgreindum gildum áreiðanleika og nákvæmni (2. og 23. heimild)

NOTHÆFISSTAÐLAR FYRIR AÐFERÐ TIL PRÓFUNAR Í GLASI Á HÚÐERTINGU MEÐ ENDURGERÐRI HÚÐÞEKJU MANNS

5. Nothæfisstæðlarnir eru samsettir af eftirfarandi þremur þáttum (9. heimild):

- I) grundvallarþáttum prófunaraðferðarinnar
- II) lágmarksskrá yfir viðmiðunariðefni
- III) skilgreindum gildum fyrir áreiðanleika og nákvæmni

I) Grundvallarþættir prófunaraðferðarinnar

6. Þeir samanstanda af grundvallarþáttum byggingar, virkni og tilhögunar fullgiltrar aðferðar sem skulu teknir með í aðferðarlýsingu fyrir tillagða eða breyttra aðferð sem er samsvarandi fullgiltu aðferðinni með tilliti til verkunarmáta og virkni. Þessir þættir fela í sér séreiginleika aðferðarinnar, mikilvæg atriði varðandi tilhögun og gæðaeftirlitsráðstafanir. Ef grundvallarþáttum í prófunaraðferð er fylgt er auðveldara að tryggja að tillögð, samsvarandi eða breytt aðferð sé byggð á sömu hugmyndum og tilheyrandi fullgilt tilvísunaraðferð (9. heimild). Grundvallarþáttum í prófunaraðferðinni er lýst í smáatriðum í 16.–21. mgr. prófunaraðferðarinnar og prófun skal framkvæmd samkvæmt eftirfarandi:

- almennum aðstæðum (16. mgr.)
- virkniaðstæðum, en meðal þeirra eru:
 - lífvænleiki (17. mgr.),
 - tálma virkni (18. mgr.),
 - formfræði (19. mgr.),
 - samanburðarnákvæmni (20. mgr.) og
 - gæðaeftirlit (21. mgr.).

II) Lágmarksskrá yfir viðmiðunariðefni

7. Viðmiðunariðefni eru notuð til að ákvarða hvort áreiðanleiki og nákvæmni tillagðrar, samsvarandi eða breyttrar aðferðar, sem hefur verið sannað að er nægilega sambærileg fullgiltu tilvísunaraðferðinni með tilliti til byggingar og virkni eða sem felur í sér minni háttar breytingu á einni af fullgiltu tilvísunaraðferðunum þremur, eru a.m.k. jafnmikil og í fullgiltu tilvísunaraðferðinni eða meiri (2., 8., 16. og 23. heimild). Meðal ráðlögðu viðmiðunariðefnanna 20, sem skráð eru í töflu 1, eru iðefni sem eru dæmigerð fyrir mismunandi iðefnaflokka (þ.e. undirflokka iðefna sem byggjast á virkum hópum) og dæmigerð fyrir allt svið Draize-ertingarstiganna (frá ekki ertandi til mjög ertandi). Í þessari skrá eru 10 iðefni úr 2. undirflokki HSK Sp eða reglugerðar (EB) nr. 1272/2008 og 10 óflokkuð iðefni, þar af þrjú þeirra í valkvæðum 3. undirflokki HSK Sp. Í þessari prófunaraðferð er litið á hinn valkvæða 3. flokk sem utan flokka. Iðefnin, sem eru skráð í töflu 1, eru valin úr iðefnunum, sem voru notuð í bestunarfasanum, sem fylgdi á eftir forfullgildingunni, og í fullgildingarránsókninni fyrir fullgiltu tilvísunaraðferðina, með tilliti til efnafræðilegrar virkni þeirra og eðlisástands (14. og 18. heimild). Þessi viðmiðunariðefni eru lágmarksfjöldi iðefna sem nota skal til að meta nákvæmni og áreiðanleika tillagðrar eða breyttrar aðferðar en þau skal ekki nota við þróun nýrra aðferða. Ef iðefni í skránni fæst ekki má nota önnur iðefni ef fullnægjandi tilvísunargögn í lífi liggja fyrir um þau, fyrst og fremst iðefnin sem voru notuð í bestunarfasanum, sem fylgdi á eftir forfullgildingunni, eða í fullgildingarránsókninni fyrir fullgiltu tilvísunaraðferðina. Ef þess er óskað má bæta iðefnum úr öðrum iðefnaflokkum, ef fullnægjandi tilvísunargögn í lífi liggja fyrir um þau, í lágmarksskrána yfir viðmiðunariðefni til að meta frekar nákvæmni fyrirhugaðrar prófunaraðferðar.

(⁵) Stj. tíð. EB L 225, 21.8.2001, bls. 1.

Tafla 1

Lágmarksskrá yfir viðmiðunariðefni til ákvörðunar á á nákvæmnis- og áreiðanleikagildum fyrir samsvarandi eða breyttar aðferðir með endurgerðri húðþekju manns⁽¹⁾

Íðefni	CAS-númer	Eðlisástand	Stig í lífi	Undirflokkar fullgildir tilvísunar- aðferðar í glasi	Undirfl. HSK Sp eða reglugerðar (EB) nr. 1272/2008 í lífi
1-bróm-4-klórbútan	6940-78-9	Vökvi	0	Undirflokkur 2	Utan flokka
díetýlþalat	84-66-2	Vökvi	0	Utan flokka	Utan flokka
naftalínedíksýra	86-87-3	Fast efni	0	Utan flokka	Utan flokka
allýlfenoxýasetat	7493-74-5	Vökvi	0,3	Utan flokka	Utan flokka
ísóprópanól	67-63-0	Vökvi	0,3	Utan flokka	Utan flokka
4-metýlþíóbensaldehýð	3446-89-7	Vökvi	1	Undirflokkur 2	Utan flokka
metýlsterat	112-61-8	Fast efni	1	Utan flokka	Utan flokka
heptýlbútýrat	5870-93-9	Vökvi	1,7	Utan flokka	Utan flokka
hexýlsalísýlat	6259-76-3	Vökvi	2	Utan flokka	Utan flokka
sinnamaldehyð	104-55-2	Vökvi	2	Undirflokkur 2	Utan flokka (Valkvæður 3. undirflokkur ⁽³⁾)
1-dekanól ⁽²⁾	112-30-1	Vökvi	2,3	Undirflokkur 2	Undirflokkur 2
sýklamenaldehýð	103-95-7	Vökvi	2,3	Undirflokkur 2	Undirflokkur 2
1-brómhexan	111-25-1	Vökvi	2,7	Undirflokkur 2	Undirflokkur 2
2-klórmetýl-3,5-dímetýl-4-metoxýpýridín HCl	86604-75-3	Fast efni	2,7	Undirflokkur 2	Undirflokkur 2
Dí-n-própyldísúlfíð ⁽²⁾	629-19-6	Vökvi	3	Utan flokka	Undirflokkur 2
kalíumhýdroxíð (5% vatnslausn)	1310-58-3	Vökvi	3	Undirflokkur 2	Undirflokkur 2
Bensenþíól, 5-(1,1-dímetýletýl)-2-metýl	7340-90-1	Vökvi	3,3	Undirflokkur 2	Undirflokkur 2
1-metýl-3-fenýl-1-píperasín	5271-27-2	Fast efni	3,3	Undirflokkur 2	Undirflokkur 2
Heptanal	111-71-7	Vökvi	3,4	Undirflokkur 2	Undirflokkur 2
tetraklóretýlen	127-18-4	Vökvi	4	Undirflokkur 2	Undirflokkur 2

⁽¹⁾ Val á íðefnum byggist á eftirfarandi viðmiðunum: i) Íðefnin fást á almennum markaði, ii) þau eru dæmigerð fyrir allt svið Draize-ertingarstiganna (frá ekki ertandi til mjög ertandi), iii) þau hafa vel skilgreinda efnafræðilega byggingu, iv) þau eru dæmigerð fyrir efnafræðilegu virknina sem notuð er í fullgildingarferlinu og v) þau hafa ekki mjög mikla eiturhrifaeiginleika (t.d. krabbameinsvaldandi áhrif eða eiturhrif á æxlunarfæri) og þeim fylgir ekki óásættanlegur förgunarkostnaður.

⁽²⁾ Samkvæmt HSK Sp en ekki í reglugerð (EB) nr. 1272/2008

⁽³⁾ Íðefni sem eru ertandi fyrir kanínur en fyrir liggja áreiðanleg gögn um að þau séu ekki ertandi fyrir menn (31.–33. heimild).

III) Skilgreind gildi fyrir áreiðanleika og nákvæmni

8. Til að ákvarða áreiðanleika og gildi tillagðra, samsvarandi eða breyttra aðferða, sem til stendur að færa á milli rannsóknarstofa, skal gera prófun á öllum viðmiðunariðefnunum 20 í töflu 1 á a.m.k. þremur rannsóknarstofum. Ef einungis á að nota tillögðu aðferðina á einni rannsóknarstofu útheimtir fullgilding þó ekki fjölsetra prófun. Hinsvegar er nauðsynlegt að alþjóðlega viðurkenndir fullgildingaraðilar meti slíkar fullgildingarrannsóknir sjálfstætt í samræmi við alþjóðlegar viðmiðunarreglur (9. heimild). Prófa skal öll viðmiðunariðefnin 20 á hverri rannsóknarstofu í þremur sjálfstæðum keyrslum sem eru framkvæmdar með mismunandi vefjalotum og með hæfilegu millibili. Hver keyrsla skal samanstanda af a.m.k. þremur samskeiðaprófuðum, samhlíða vefjasýnum fyrir hvert viðkomandi prófunariðefni og neikvæðan og jákvæðan samanburð.
9. Útreikningar á áreiðanleika- og nákvæmnisgildum tillögðu aðferðarinnar skulu gerðir með hliðsjón af öllum viðmiðununum fjórum hér á eftir til að tryggja að gildi fyrir áreiðanleika og nákvæmni séu reiknuð út á fyrirframskilgreindan og samkvæman hátt:
 1. Einungis er hægt að nota gögn úr keyrslum í heilum keyrsluröðum (e. *complete run sequences*) til að reikna breytileika aðferðarinnar og forspárgildi (nákvæmni) innan hversrar rannsóknarstofu og milli rannsóknarstofa.
 2. Lokaflokkun hvers viðmiðunariðefnis á hverri hlutaðeigandi rannsóknarstofu skal fengin með því að nota meðalgildi lífvænleika í hinum mismunandi keyrslum innan heillar keyrsluraðar.
 3. Einungis er hægt að nota gögn um íðefni, sem hafa farið í gegnum heilar keyrsluraðir í öllum hlutaðeigandi rannsóknarstofum, til að reikna breytileika aðferðarinnar milli rannsóknarstofa.
 4. Útreikningur á nákvæmnisgildunum skal gerður samkvæmt spám frá sérhverri hinna mismunandi, hlutaðeigandi rannsóknarstofa fyrir viðmiðunariðefnin 20.

Í þessu samhengi samanstendur heil keyrsluröð af þremur sjálfstæðum keyrslum á einni rannsóknarstofu fyrir eitt prófunariðefni. „Heil keyrsluröð“ er keyrsluröð á einni rannsóknarstofu fyrir eitt prófunariðefni þar sem allar keyrslurnar þrjár eru gildar. Í því felst að ein ógild keyrsla ógildir heila keyrsluröð með þremur prófunum.

Samanburðarnákvæmni innan rannsóknarstofu

10. Mat á samanburðarnákvæmni innan rannsóknarstofu skal sýna að samræmi í flokkun (í 2. undirflokk og utan flokka í HSK SP eða reglugerð (EB) nr. 1272/2008), samkvæmt mismunandi, sjálfstæðum prófunarkeyrslum á viðmiðunariðefnunum 20 á einni rannsóknarstofu, sé 90% eða meira.

Samanburðarnákvæmni milli rannsóknarstofa

11. Mat á samanburðarnákvæmni milli rannsóknarstofa er ekki nauðsynlegt ef aðeins skal nota tillagða prófunaraðferð á einni rannsóknarstofu. Ef færa á aðferðir milli rannsóknarstofa skal samræmi í flokkun (í 2. undirflokk og utan flokka í HSK SP eða reglugerð (EB) nr. 1272/2008), samkvæmt mismunandi, sjálfstæðum prófunarkeyrslum á viðmiðunariðefnunum 20, helst hjá minnst þremur rannsóknarstofum, vera 80% eða meira.

Forspárgeta (nákvæmni)

12. Nákvæmni (næmi, sértæki og heildarnákvæmni) tillögðu, samsvarandi eða breyttu aðferðarinnar skal vera a.m.k. sambærileg við fullgiltu tilvísunaraðferðina eða meiri, að teknu tilliti til viðbótarupplýsinga varðandi gildi í dýrategundinni sem miðað er við (tafla 2). Næmið skal vera jafnt eða meira (\geq) en 80% (2., 8. og 23. heimild). Þó gildir frekari, sértæk takmörkun um næmi tillögðu aðferðarinnar til prófunar í glasi þar eð aðeins tvö íðefni í 2. undirflokki, samkvæmt prófun í lífi, þ.e. 1-dekanól og dí-n-própýldisúlfíð, mega flokkast ranglega með aðferðinni sem utanflokka hjá fleiri en einni hlutaðeigandi rannsóknarstofu. Sértækið skal vera jafnt eða meira (\geq) en 70% (2., 8. og 23. heimild). Það eru ekki fleiri takmarkanir að því er varðar sértæki tillögðu aðferðarinnar til prófunar í glasi, þ.e. hverri hlutaðeigandi rannsóknarstofu er heimilt að rangflokka íðefni, sem eru prófuð í lífi, sem utanflokka, að því tilskildu að lokasértæki prófunaraðferðarinnar sé innan ásættanlegra marka. Heildarnákvæmnin skal vera jöfn eða meiri (\geq) en 75% (2., 8. og 23. heimild). Þó að næmi fullgiltu tilvísunaraðferðarinnar, sem er reiknað út fyrir viðmiðunariðefnin 20 í töflu 1, sé 90% er skilgreinda gildið fyrir lágmarksnæmi, sem þarf til að samsvarandi eða breytt aðferð teljist gild, ákvarðað 80% þar eð vitað er að bæði 1-dekanól (íðefni með óvissa flokkun) og dí-n-própýldisúlfat (falsneikvætt með fullgiltu tilvísunaraðferðinni) eru ekki ertandi fyrir menn (31.–33. heimild) þótt þau greinist ertandi í prófun á kaninum. Þar eð líkön með endurgerðri húðþekju manns byggjast á frumum manns geta þau gefið þá spá fyrir þessi íðefni að þau séu ekki ertandi (utan flokka í HSK SP eða reglugerð (EB) nr. 1272/2008).

Tafla 2

Forspárgildin fyrir næmi, sértæki og heildarnákvæmni sem krafist er til að samsvarandi eða breytt aðferð teljist gild

Næmi	Sértæki	Heildarnákvæmni
≥ 80%	≥ 70%	≥ 75%

Viðmiðanir fyrir samþykkt rannsóknar

- Hugsanlegt er að ein eða fleiri prófanir á einu eða fleiri prófunariðefnum uppfylli ekki samþykktarviðmiðanir prófunar fyrir prófunar- og samanburðariðefnin eða séu ekki samþykktarhæfar af öðrum ástæðum. Heimilt er að gera að hámarki tvær viðbótarprófanir fyrir hvert prófunariðefni (endurprófun) til að bæta upp gögn sem vantar. Nánar tiltekið: þar eð einnig þarf að gera samskeiða prófun á jákvæða og neikvæða samanburðinum við endurprófun má að hámarki gera tvær viðbótarkeyrslur fyrir hvert prófunariðefni.
- Hugsanlegt er að jafnvel eftir endurprófun náist ekki sá lágmarksfjöldi þriggja gilda keyrslna, sem er tilskilinn fyrir hvert prófað íðefni, fyrir hvert viðmiðunariðefni á hverri hlutaðeigandi rannsóknarstofu og því sé gagnæfniviðurinn ófullnægjandi. Í slíkum tilvikum skal uppfylla allar eftirfarandi þrjár viðmiðanir til að gagnasöfnin teljist ásættanleg:
 - Öll viðmiðunariðefnin 20 skulu fara í gegnum a.m.k. eina heila keyrsluröð.
 - Á hverri af minnst þremur hlutaðeigandi rannsóknarstofum skulu a.m.k. 85% keyrsluraðanna vera heilar (fyrir 20 íðefni, þ.e. þrjár ógildar keyrsluraðir eru heimilar hjá einni rannsóknarstofu).
 - Að minnsta kosti 90% af öllum hugsanlegum keyrsluröðum frá minnst þremur rannsóknarstofum verða að vera heilar (fyrir 20 íðefni sem eru prófuð hjá þremur rannsóknarstofum, þ.e. alls 6 ógildar keyrsluraðir eru heimilar).“

- Eftirfarandi kaflar bætist við:

„B.49 SMÁKJARNAPRÓFUN Í GLASI Á SPENDÝRAFRUMUM

INNGANGUR

- Smákjarnaprófun í glasi er prófun á erfðaeiturhrifum til að greina smákjarna í umfrymi í millifasa frumna. Smákjarnar geta átt uppruna sinn í brotum af óheftum litningum (þ.e. sem vantar þráðhaft) eða heilum litningum sem ná ekki að færast að skautunum í síðfasa frumuskiptingar. Prófunin greinir virkni litningaskemmandi og mislitunarvaldandi íðefna (efna og blandna) (1. og 2. heimild) í frumum sem hafa skipt sér meðan á váhrifum frá prófunarefninu stóð eða eftir það. Þessi prófunaraðferð gerir kleift að nota aðferðarlýsingar með og án aktín-fjölliðunarlatans sýtókalasíns-B (e. *actin polymerisation inhibitor cytochalasin B (cytoB)*). Efsýtókalasíni-B er bætt við fyrir markmítósuna (e. *targeted mitosis*) er hægt að ákvarða og greina valvist tíðni smákjarna í frumum sem hafa lokið einu jafnskiptingarferli vegna þess að slíkar frumur eru tvíkjarna. Þessi prófunaraðferð gerir einnig kleift að nota aðferðarlýsingar án hindrunar á umfrymisskiptingu (e. *cytokinesis block*), að því tilskildu að frumurnar í greiningarhópnum hafi skipt sér.
- Auk þess að nota smákjarnaprófun í glasi til að greina íðefni (efni og blöndur) sem framkalla smákjarna geta hindrun á umfrymisskiptingu, ónæmisefnafræðileg merking þráðhalda eða þáttatengingar með þráðhafts- eða litningsendapreifurum (flúrljómandi, staðbundin þáttatenging (FISH-tækni)) einnig veitt upplýsingar um gangvirki litningaskemmda og myndunar smákjarna (5.–16. heimild). Hægt er að nota aðferðir með merkingu og þáttatengingu ef það er aukning í smákjarnamyndun og rannsakandinn vill ákvarða hvort aukningin hafi verið af völdum atburða sem valda litningaskemmdum og/eða sem valda mislitnun.
- Smákjarnar sýna fram á skaða sem hefur flust áfram til dótturfruma en litningabreytingar sem finnast í frumum í miðfasa flytjast ekki endilega áfram. Þar eð hægt er að meta smákjarna í frumum í millifasa á tiltölulega hlutlægan hátt þarf starfsfólk rannsóknarstofunnar aðeins að ákvarða hvort frumurnar hafa skipt sér eða ekki og í hve mörgum frumum séu smákjarnar. Þar af leiðandi er hægt að meta efnablöndurnar frekar hratt og hafa greininguna sjálfvirka. Það er því hagnýtt að greina þúsundir frumna í hverri meðhöndlun í stað hundraða frumna en það eykur styrk prófunarinnar. Þar eð smákjarnar geta orðið til út frá litningum sem sitja eftir er unnt að greina efni sem valda mislitnun og sem erfitt er að rannsaka í hefðbundnum prófunum á litningabreytingum, t.d. eins og þeirri sem er lýst í OECD-viðmiðunareglu 473 um prófanir (kafla B.10 í þessum viðauka) (17. heimild). Smákjarnaprófun í glasi gerir þó ekki kleift að greina íðefni sem valda fjöllitnun frá þeim sem valda litningaskemmdum, án sérstakra aðferða, s.s. FISH-tækninnar sem lýst er í 2. mgr.

4. Að jafnaði eru notaðar ræktaðar frumur manns eða nagdýrs við smákjarnaprófun í glasi. Hún myndar breiðan grundvöll undir rannsóknir í glasi á mættinum til litningaskemmda þar eð hægt er að greina bæði efni sem valda mislitnun og efni sem valda litningaskemmdum.
5. Smákjarnaprófun í glasi er traust og árangursrík fyrir margskonar frumugerðir, hvort sem sýtókalasín-B er notað eða ekki. Til eru víðtæk gögn sem styðja gildi smákjarnaprófunar í glasi þar sem notaðar eru margskonar nagdýrafrumulínur (CHO, V79, CHL/IU og L5178Y) og eitelfrumur manns (18.–31. heimild). Meðal þeirra eru einkum alþjóðlegar fullgildingarrannsóknir, sem „*Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG)*“ gerði (18.–22. heimild) og skýrslur frá „*International Workshop on Genotoxicity Testing*“ (4. og 16. heimild). Fyrirliggjandi gögn hafa einnig verið endurmetin með afturvirkri fullgildingarrannsókn á grundvelli vægis rökstuddra vísbindinga, sem Evrópumíðstöð um fullgildingu staðgönguáðferða (ECVAM) á vegum framkvæmdastjórnar Evrópusambandsins gerði, og vísindaleg ráðgjafarnefnd Evrópumíðstöðvarinnar hefur fallist á að prófunaraðferðin sé vísindalega gild (32.–34. heimild). Notkun á eitilímfrumulínu úr mönnum TK6 (35. heimild), HepG2-frumum (36. og 37. heimild) og fyrsta stigs fósturfrumum úr gullhamstri (e. *Syrian Hamster*) (38. heimild) hefur verið lýst þótt þær hafi ekki verið notaðar í fullgildingarrannsóknum.

SKILGREININGAR

6. Skilgreiningar, sem eru notaðar, eru gefnar upp í 1. viðbæti.

ATRÍÐI SEM ÞARF AÐ HAGA Í HUGA Í UPPHAFI

7. Prófanir, sem eru gerðar í glasi, útheimta að jafnaði útræna efnaskiptavirkjun nema frumurnar hafi efnaskiptasvörun við efnið sem er verið að prófa. Útrænt kerfi efnaskiptavirkjunar getur ekki líkt fullkomlega eftir þeim aðstæðum sem ríkja í lífi. Þess skal gætt að ekki komi upp aðstæður sem gætu leitt til niðurstaðna sem eru jákvæðar vegna gervinga, endurspeglar ekki eðlislæg stökkbreytishrif og geta skapast vegna þátta eins og greinilegra breytinga á pH-styrk eða osmólalstyrk eða vegna mikilla frumueiturhrifa (39.–41. heimild). Ef prófunariðefnið veldur breytingu á pH-styrk ætिसins þegar því er bætt í skal stilla pH-styrkinn af, helst með því að jafna stofnlausnina svo að allt rúmmál haldist eins við allan prófunarstyrk og fyrir allan samanburð.
8. Við greiningu á framköllum smákjarna þarf mítósa að hafa farið fram, bæði í meðhöndluðu og ómeðhöndluðu ræktinni. Það gefur mestar upplýsingar að telja smákjarna í frumum sem hafa lokið einni mítósu að fullu meðan á meðhöndlun með prófunarefninu stóð eða eftir hana.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

9. Frumur, ræktaðar úr manna- eða spendýrafrumum, eru láttnar verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu, bæði með og án útrænnar efnaskiptavirkjunar, nema notaðar séu frumur sem hafa fullnægjandi getu til efnaskiptavirkjunar. Samskeiða samanburður með leysi eða burðarefni og jákvæðum samanburðaríðefnum er hafður með í öllum prófunum.
10. Frumurnar eru ræktaðar nógu lengi, meðan á váhrifum vegna prófunarefnisins stendur eða eftir þau, til að skemmdir á litningum eða spólu leiði til myndunar smákjarna í frumum í millifasa. Að öllu jöfnu skal prófunarefnið vera fyrir hendi meðan á mítósu stendur ef það á að valda mislitnun. Litaðar frumur í millifasa eru heimtar (e. *harvested*) og greint hvort í þeim séu smákjarnar. Best er að telja aðeins smákjarna í þeim frumum sem luku mítósu að fullu meðan á váhrifum frá prófunarefninu stóð eða á tímabilinu eftir váhrif, ef það tímabil er notað. Í ræktum, sem hafa verið meðhöndlaðar með hindrun á umfrymisskiptingu, er þessu náð fram með því að telja aðeins frumur sem eru tvíkjarna. Ef ekki er notuð hindrun á umfrymisskiptingu er mikilvægt að sýna fram á líklegt sé að frumurnar, sem eru greindar, hafi skipt sér meðan á váhrifum frá prófunarefninu stóð eða eftir þau. Mikilvægt er að sýna fram á, í öllum aðferðarlýsingum, að frumufjölgun hafi orðið bæði í samanburðarræktinni og meðhöndluðu ræktinni og það skal metið í ræktunum (eða í samhlíða ræktunum), sem smákjarnar eru taldir í, að hvaða marki prófunarefnið hafi framkallað frumueiturhrif eða frumuhamningu (e. *cytostasis*).

LÝSING Á GREININGUNNI

Undirbúningur

11. Nota má eitelfrumur, sem eru ræktaðar beint úr útæðablóði manns (5., 19., 42. og 43. heimild), og ýmsar nagdýrafrumulínur, s.s. CHO, V79, CHL/IU og L5178Y (18.–22., 25.–28. og 30. heimild). Rökstuðningur fyrir notkun á öðrum frumulínum og frumugerðum skal byggjast á nothæfi þeirra, sem sýnt er fram á í prófuninni, eins og lýst er í þættinum um viðmiðanir fyrir ásættanleika. Þar eð bakgrunnstíðni (e. *background frequency*) smákjarna hefur áhrif á næmi prófunarinnar er mælt með því að nota frumugerðir sem hafa lága og stöðuga bakgrunnstíðni smákjarnamyndunar.

- Eitilfrumur úr útæðablóði manns skulu fengnar úr ungum, heilbrigðum einstaklingum (u.þ.b. 18–35 ára) sem reykja ekki og sem ekki er vitað til að hafi nýlega orðið fyrir váhrifum frá iðefnum, sem valda erfðaeiturhrifum, eða frá geislun. Ef frumur úr fleiri en einum gjafa eru hópaðar fyrir notkun skal tilgreina fjölda gjafanna. Tíðni smákjarna eykst með aldri og þessi leitni er greinilegri hjá konum en körlum (44. heimild) og skal taka tillit til þess þegar valdar eru gjafafrumur til hópunar.

Æti og ræktunaraðstæður

- Til að viðhalda frumum í rækt skal nota viðeigandi ræktunaræti og láta þær standa við heppilegar aðstæður (ræktunarlát, styrkur CO², hiti og raki). Fylgjast skal að staðaldri með skilgreindum frumulinum og -stofnum til að ganga úr skugga um að dæmigerður litningafjöldi sé stöðugur og að ekki sé um berfrymingasmit að ræða, en ekki skal nota frumur með slíku smiti eða ef dæmigerður litningafjöldi hefur breyst. Nauðsynlegt er að vita hver eðlileg lengd frumuhringins er við ræktunaraðstæðurnar sem eru notaðar í prófunarstofunni. Ef umfrymisskipting er hindruð skal styrkur skiptingarlatans (e. *cytokinesis inhibitor*) bestaður fyrir þá tilteknu frumugerð og skal sýnt fram á að með honum fáiast nóg af tvíkjarna frumum til talningar.

Tilreiðsla rækta

- Skilgreindar frumulínur og -stofnar: frumur eru teknar úr geymslustofnum, sáð á ræktunaræti, í þeim þéttleika að ræktirnar renni ekki saman í einlagi (e. *monolayer*) og ræktir í sviflausn nái ekki of miklum þéttleika áður en frumurnar eru heimtar, og látnar standa við 37 °C.
- Eitilfrumur: heilblóð, sem er meðhöndlað með segavarnarefni (t.d. heparíni), eða stakar eitilfrumur eru ræktaðar, að viðbættum ræsi fyrir frumuskípting, t.d. fýtohemaglútínini (e. *phytohemagglutinin*, (PHA)), áður en kemur að váhrifum frá prófunarefninu og sýtókallasíni-B.

Efnaskiptavirkjun

- Nota skal útræn efnaskiptakerfi þegar notaðar eru frumur sem hafa ófullnægjandi getu til útrænna efnaskipta. Algengast er að nota kerfi með hvatberasneyddum frumusafa (hér á eftir „S9“) með viðbættum hjálparþætti, sem er unninn úr nagdýralífu og meðhöndlaður með ensimörvandi efnum, s.s. Aroclor 1254 (45. og 46. heimild), eða blöndu fenóbarbítóns og β-naptóflavóns (46.–49. heimild). Síðarnefnda samsetningin stríðir ekki gegn Stokkhólmssamningnum um þrávirk lífræn efni (50. heimild) né reglugerð (EB) nr. 850/2004 um þrávirk, lífræn mengunarefni (66. heimild) og sýnt hefur verið fram á að hún sé jafn árangursrík og Aroclor 1254 til að kalla fram oxídasa sem gegna mismunandi hlutverki (46.–49. heimild). S9 er venjulega hafður í styrk sem er frá 1–10% að rúmmálshlutfalli í síðasta prófunarætinu. Ástand efnaskiptavirkjunarkerfis getur ráðist af því úr hvaða flokki prófunariðefnið er og í sumum tilvikum getur hentað að nota S9 í fleiri en einum styrkleika.
- Erfðabreyttar frumulínur, sem tjá sérhæfð, virkjandi ensím úr mönnum eða nagdýrum, geta útilokað þörfina á útrænu efnaskiptavirkjunarkerfi og hægt er að nota þær sem prófunarfrumurnar. Í þeim tilvikum skal færa vísindaleg rök fyrir vali á frumulínunum sem eru notaðar, t.d. með gildi oxídasa, sem gegna mismunandi hlutverki, fyrir efnaskipti prófunarefnisins (51. heimild) og svörum þeirra við efnun, sem eru þekkt að því að valda litningaskemmdum, og efnun sem valda mislitnun (sjá þáttinn um viðmiðanir fyrir ásættanleika). Hafa skal í huga að efnið, sem er prófað, tekur e.t.v. ekki breytingum í efnaskiptum fyrir tilstilli tjáðu oxíðasanna, sem gegna mismunandi hlutverki, og að í því tilviki eru neikvæðar niðurstöður ekki til marks um að ekki geti verið smákjarni í prófunarefninu.

Undirbúningur prófunarefnis

- Íðefni í föstu formi skulu leyst upp í viðeigandi leysum eða burðarefnum og, ef við á, þynnt áður en frumurnar eru meðhöndlaðar. Setja má fljótandi iðefni beint út í prófunarkerfin og/eða þynna þau fyrir meðhöndlunina. Lofttegundir eða rokgjörn iðefni skulu prófuð með viðeigandi breytingum á staðlaðri aðferðarlýsingu, s.s. meðhöndlun í innsigliðum kerjum (52. og 53. heimild). Nota skal ferskar blöndur af prófunarefninu nema gögn um stöðugleika staðfesti að efnið þoli geymslu.

Prófunaraðstæður

Leysar eða burðarefni

- Leysirinn eða burðarefnið skal ekki hvarfast við prófunarefnið eða vera ósamrýmanlegt við lífun frumnanna eða viðhald S9-virkinnar við styrkinn sem er notaður. Ef notaðir eru aðrir leysar eða önnur burðarefni en hin velþekktu (t.d. vatn, frumuræktaræti eða dímetýlsúlfíð) skal notkun þeirra studd gögnum sem sýna að þau séu samrýmanleg við prófunarefnið og hafi ekki erfðaeiturhrif. Mælt er til þess, verði því við komið, að fyrst sé kannað hvort nota megi vatnskenndan leysi eða burðarefni.

Notkun sýtókalasíns-B til að hindra umfrymisskiptingu

20. Einn mikilvægasti þátturinn í framkvæmd smákjarnaprófunarinnar í glasi er að tryggja að frumurnar, sem er talið í, hafi lokið mítósu að fullu meðan á meðhöndluninni stóð eða, ef um það er að ræða, á stöðutímabilinu eftir meðhöndlun. Sýtókalasín-B er efnið sem er mest notað til að hindra umfrymisskiptingu vegna þess að það letur samsöfnun aktíns og kemur þannig í veg fyrir aðskilnað dótturfrumna eftir mítósu, sem aftur hefur í för með sér myndun tvíkjarna frumna (5., 54. og 55. heimild). Því er hægt að takmarka talningu á smákjörnum við frumur sem hafa lokið mítósu meðan á meðhöndlun stóð eða eftir hana. Hægt er að mæla áhrif prófunarefnisins á hvarfafræði frumufjölgunar um leið. Ef eitilfrumur úr mönnum eru notaðar skal nota sýtókalasín-B til að hindra umfrymisskiptingu vegna þess að lengd frumuhringja er breytileg innan rækta og milli gjafa og vegna þess að eitilfrumur bregðast ekki allar við fýtóhemaglútíníni. Aðrar aðferðir hafa verið notaðar þegar gerðar eru prófanir á frumulínum til að ákvarða hvort frumurnar, sem verið er að telja í, hafi skipt sér og er fjallað um þær aðferðir hér á eftir (sjá. 26. mgr.)

21. Rannsóknarstofan skal ákvarða viðeigandi styrk sýtókalasíns-B fyrir hverja frumugerð til að ná fram kjörtíðni tvíkjarna frumna í samanburðarræktinni með leysinum eða burðarefninu. Viðeigandi styrkur sýtókalasíns-B er að jafnaði milli 3 og 6 $\mu\text{g/ml}$.

Mælingar á frumufjölgun og frumueiturhrifum og val á styrk váhrifa

22. Þegar hæsti styrkur prófunarefnis í prófun er ákvarðaður skal forðast styrk sem getur valdið svörun sem er jákvæð vegna gervinga, s.s. styrk sem veldur óhóflegum frumueiturhrifum, útfellingu í ræktunaráttinu og greinilegum breytingum á pH-styrk eða osmólalstyrk (39.–41. heimild).

23. Gerðar eru mælingar á frumufjölgun til að tryggja að meðhöndluðu frumurnar hafi lokið mítósu meðan á prófuninni stóð og að meðhöndlun fari fram við viðeigandi styrk frumueiturhrifa (sjá 29. mgr.) Ákvarða skal frumueiturhrif með og án efnaskiptavirkjunar í frumum, sem þarfnast efnaskiptavirkjunar, með því að nota hlutfallslega aukningu frumufjölda (e. *relative increase in cell counts* (RICC)) eða hlutfallslega tvöföldun hóps (e. *relative population doubling* (RPD))(sjá formúlur í 2. viðbæti) nema notað sé sýtókalasín-B. Ef sýtókalasín-B er notað er hægt að ákvarða frumueiturhrif með því að nota eftirmyndunarstuðulinn (e. *replication index* (RI)) (sjá formúlu í 2. viðbæti).

24. Meðhöndlun með sýtókalasíni-B og mælingar á hlutfallslegri tíðni einkjarna, tvíkjarna og margkjarna frumna í ræktinni er nákvæm aðferð við magngreiningu á áhrifum á frumufjölgun og frumueiturhrif frumuhemjandi virkni meðhöndlunar (5. heimild) og tryggir að aðeins er talið í frumum sem hafa skipt sér meðan á meðhöndlun stóð eða eftir hana.

25. Í rannsóknnum, þar sem sýtókalasín-B er notað, er hægt að magngreina frumuhamningu eða frumueiturhrif, með því að nota fjölgunarstuðulinn fyrir frumur, sem skipting umfrymis er hindruð í (e. *cytokinesis-block proliferation index* (CBPI)) (5., 26. og 56. heimild), eða leiða það af eftirmyndunarstuðli a.m.k. 500 frumna í hverri rækt (sjá formúlur í 2. viðbæti). Ef sýtókalasín-B er notað til að meta frumufjölgun skal ákvarða fjölgunarstuðul fyrir frumur, sem skipting umfrymis hefur verið hindruð í, eða eftirmyndunarstuðul út frá a.m.k. 500 frumum í hverri rækt. Þessar mælingar, ásamt öðrum, er hægt að nota til að meta frumueiturhrif með því að bera saman gildi í meðhöndluðu ræktinni og samanburðarræktinni. Mat á öðrum merkjum um frumueiturhrif (t.d. samrennsli (e. *confluency*), frumufjöldi, stýrður frumudauði, drep, talning á frumum í miðfasa) getur veitt gagnlegar upplýsingar.

26. Í rannsóknnum, þar sem sýtókalasín-B er ekki notað, er nauðsynlegt að sýna fram á að frumurnar í ræktinni, sem talið er í, hafi skipt sér meðan á meðhöndluninni með prófunarefninu stóð eða eftir hana því að annars geta niðurstöðurnar orðið falsneikvæðar. Meðal aðferða, sem hafa verið notaðar til að tryggja að talið sé í frumum sem hafa skipt sér, er íblöndun og því næst greining á brómdeoxýrídíni til að finna frumur sem hafa fjölgað sér (57. heimild), myndun klóna þegar frumur úr stöðugum frumulínum eru meðhöndlaðar og talið er í þeim á staðnum á smásjargleri (fjölgunarstuðull (e. *proliferation index* (PI)) (25.–28. heimild) eða mæling á hlutfallslegri tvöföldun hóps eða hlutfallslegri aukningu frumufjölda eða aðrar áreiðanlegar aðferðir (16., 56., 58. og 59. heimild) (sjá formúlur í 2. viðbæti). Mat á öðrum merkjum um eiturrhrif eða frumuhamningu (t.d. samrennsli, frumufjöldi, stýrður frumudauði, drep eða talning á frumum í miðfasa) getur veitt gagnlegar upplýsingar.

27. Meta skal a.m.k. þrenns konar prófunarstyrkleika sem unnt er að greina. Til þess að það náist getur verið nauðsynlegt að gera rannsóknina með fleiri styrkleikum og minna bili á milli styrkleika og greina myndun smákjarna við þá styrkleika þar sem viðeigandi svið frumueiturhrifa kemur fram. Önnur aðferð er að gera forprófun á frumueiturhrifum til að þrengja sviðið fyrir endanlegu prófununina.

28. Hæsti styrkur ætti að ná fram $55 \pm 5\%$ frumueiturhrifum. Hæri styrkur getur framkallað skemmdir á litningum sem annars stigs áhrif frumueiturhrifa (60. heimild). Ef frumueiturhrif verða skal prófunarstyrkurinn, sem er valinn, ná yfir svið sem veldur allt frá $55 \pm 5\%$ frumueiturhrifum til lítilla eða engra frumueiturhrifa.

29. Ef hvorki mælast frumueiturhrif né útfelling skal hæsti prófunarstyrkur samsvara 0,01 M, 5 mg/ml eða 5 µl/ml, eftir því hvort er lægra. Munurinn á styrkleikum, sem eru valdir fyrir greininguna, skal að öllu jöfnu ekki vera meiri en tugþrep. Það getur reynst nauðsynlegt að hafa muninn á styrkleikum prófunarefnisins enn minni ef ferill styrkháðrar svörunar þess er brattur til þess að einnig sé hægt að telja í ræktum á styrksviði mildra eða lítilla eiturhrifa.
30. Ef leysi er takmarkandi þáttur skal hámarksstyrkur, ef hann takmarkast ekki af frumueiturhrifum, vera lægsti styrkur sem veldur lágmarksútfellingu sem er sjáanleg í ræktunum, að því tilskildu að útfellingin trufla ekki talninguna. Mat á útfellingu skal unnið með aðferðum á borð við ljösmásjá sem greinir útfellingu sem er viðvarandi eða sem birtist á meðan á ræktinni stendur (við lok meðhöndlunarinnar).
- Samanburður
31. Í hverri tilraun skal vera samskeiða, jákvæður samanburður og samanburður með leysi eða burðarefni, bæði með efnaskiptavirkjun og án hennar.
32. Jákvæður samanburður er nauðsynlegur til að sýna fram á getu frumanna, sem eru notaðar, og aðferðarlýsingarinnar fyrir prófunina til að greina efni sem valda litningaskemmdum og efni sem valda mislitnun og til að staðfesta efnaskiptagetu S9-efnablöndunnar. Við jákvæða samanburðinn skal nota efni sem eru þekkt að því að valda myndun smákjarna við styrkleika sem er búist við að valdi lítilli en samanburðarnákvæmri aukningu umfram bakgrunninn og sýni fram á næmi prófunarkerfisins. Velja skal styrkleika fyrir jákvæða samanburðinn þannig að áhrifin séu skýr en þó þannig að sá sem les af átti sig ekki strax á því hvert kóðaða sýnisgerið er.
33. Nota skal efni sem veldur litningaskemmdum og þarf efnaskiptavirkjun (t.d. með sýklófosfamíði eða bensól[a]pýreni) til að sýna fram á bæði efnaskiptagetu prófunarkerfisins og hæfni prófunarkerfisins þess til að greina efni sem valda litningaskemmdum. Nota má önnur jákvæð samanburðarefni ef færð eru rök fyrir því. Þar eð sum jákvæð samanburðarefni, sem þurfa efnaskiptavirkjun, geta verið virk án útrænnar efnaskiptavirkjunar við tiltekna meðhöndlunaraðstæður eða í tilteknum frumulínum skal prófa þörfina fyrir efnaskiptavirkjun og virkni S9-efnablöndunnar á valinni frumulínu og við valda styrkleika.
34. Eins og sakir standa er ekki vitað um efni sem valda mislitnun og þurfa efnaskiptavirkjun fyrir erfðaeiturhrifavirkni sína (16. heimild). Jákvæð samanburðarefni, sem nú teljast ásættanleg til að sýna fram á mislitnunarvirkni, eru t.d. kolsísín og vínblastín. Nota má önnur íðefni ef þau framkalla smákjarna eingöngu eða aðallega með mislitnunarvirkni. Til að koma í veg fyrir þörfina á tveimur jákvæðum samanburðariðefnum (vegna litningaskemmda og mislitnunar) án efnaskiptavirkjunar er hægt að nota mislitnunarvaldandi samanburðarefnið sem jákvæðan samanburð án S9 og samanburðarefnið sem veldur litningaskemmdum er hægt að nota til að prófa hvort kerfið, sem er notað til efnaskiptavirkjunar, sé fullnægjandi. Nota skal jákvæðan samanburð, bæði fyrir litningaskemmandi og mislitnunarvaldandi efni, í frumum sem þarfnast ekki S9. Ráðlögð efni í jákvæðan samanburð eru í 3. viðbæti.
35. Kanna má hvort nota megi íðefni við jákvæða samanburðinn sem eru úr sama flokki og prófunarefnið. Öll jákvæð samanburðariðefni skulu hafa frumugerðinni og aðstæðunum við virkjun.
36. Samanburður með leysi eða burðarefni skal hafður með í hvert sinn sem frumur eru heimtar. Auk þess skal nota neikvæðan samanburð án meðhöndlunar nema fyrir liggja birt eða rannsóknarsöguleg samanburðargögn rannsóknarstofunnar sem sýna fram á að sá leysir, sem var valinn, hafi hvorki erfðaeiturhrif né önnur skaðleg áhrif.

PRÓFUNARAÐFERÐ

Áætlun um meðhöndlun

37. Það er mikilvægt að meðhöndla nægilegan fjöldi frumna með prófunarefninu á öllum stigum frumuhings þeirra til þess að hámarka líkurnar á að greina efni sem veldur mislitnun eða efni sem veldur litningaskemmdum á tilteknu stigi í frumuhringnum. Meðhöndlunaráætlunin fyrir frumulínur og fyrsta stigs frumuræktir getur því verið öðruvísi en áætlunin fyrir eitilfrumur sem þurfa örvun með frumuskjótningaræsi (e. *mitogenic stimulation*) til að hefja frumuhring sinn og það er fjallað um þær í 41.–43. mgr.) (16. heimild).
38. Fræðilegar athuganir, sem og birt gögn, benda til þess að flest efni, sem valda mislitnun og litningaskemmdum, greinist með stutttri meðhöndlun sem varir í 3–6 klukkustundir, með eða án S9, síðan er prófunarefnið fjarlægð og við tekur vaxtarskeið sem nemur 1,5–2,0 frumuhringjum (6. heimild). Sýni eru tekin úr frumunum eftir að tími, sem jafngildir 1,5–2,0 sinnum eðlilegum frumuhring (þ.e. án meðhöndlunar), er liðinn frá annaðhvort upphafi meðhöndlunar eða lokum hennar (sjá töflu 1). Framlengja má sýnatökutímann eða afturbatátímann ef vitað er eða grunur leikur á að prófunarefnið hafi áhrif á lengd frumuhingsins (t.d. þegar verið er að gera prófun á kinnisleiðfahliðstæðum).

39. Þar eð S9-efnablöndur hafa hugsanlega frumueiturhrif á ræktaðar spendýrafrumur er framlenging á váhrifameðhöndlun um 1,5–2,0 eðlilega frumuhringi aðeins notuð án S9. Ef meðhöndlunin er framlengd eru valkostir fyrir hendi sem gera kleift að meðhöndla frumurnar með prófunariðefninu með eða án sýtókalasíns-B. Með þeim valkostum er tekist á við aðstæður þar sem hugsanlegar víxlverkanir milli prófunarefnisins og sýtókalasíns-B kunna að valda áhyggjum.
40. Ráðlagðar áætlanir um meðhöndlun eru kynntar í töflu 1. Heimilt er að breyta þessum almennu áætlunum um meðhöndlun eftir stöðugleika eða hvarfgirni prófunarefnisins eða tilteknum vaxtareiginleikum frumnanna sem eru notaðar. Hefja skal og ljúka allri meðhöndlun meðan frumurnar eru í veldisvexti. Þessar áætlanir eru kynntar ítarlegar í 41.–47. mgr. hér á eftir.

Tafla 1

Tímasetningar meðhöndlunar og heimtar á frumum fyrir smákjarnapröfun í glasi

Eitilfrumur, fyrsta stigs frumur og frumulínur, meðhöndlaðar með sýtókalasíni-B	+ S9	Meðhöndlaðar í 3–6 klst., að viðbættum S9, S9 og meðhöndlunarætið eru fjarlægð, nýju æti og sýtókalasíni-B er bætt í, heimtar 1,5–2,0 eðlilegum frumuhringum síðar.
	– S9 Stutt váhrif	Meðhöndlaðar í 3–6 klst., meðhöndlunarætið er fjarlægt, nýju æti og sýtókalasíni-B er bætt í, heimtar 1,5–2,0 eðlilegum frumuhringum síðar.
	– S9 Framlengd váhrif	<i>Valkostur A:</i> Meðhöndlaðar í 1,5–2 eðlilega frumuhringi, að viðbættu sýtókalasíni-B, heimtar við lok váhrifatímabilsins. <i>Valkostur B:</i> Meðhöndlaðar í 1,5–2,0 eðlilega frumuhringi, prófunarefnið fjarlægt, nýju æti og sýtókalasíni-B er bætt í, heimtar 1,5–2,0 eðlilegum frumuhringjum síðar.

Frumulínur sem eru meðhöndlaðar án sýtókalasíns-B

(Eins og áætlanirnar um meðhöndlun sem lýst er hér að framan nema að því leyti að engu sýtókalasíni-B er bætt í)

Eitilfrumur, fyrsta stigs frumur og frumulínur með sýtókalasíni-B

41. Ef um er að ræða eitilfrumur er skilvirkasta aðferðin að hefja váhrif á þær frá prófunarefni 44–48 klst. eftir örvun með fýtóhemaglútíníni þegar samræming frumuhringjanna er horfin (5. heimild.) Í upphafspröfuninni eru frumur meðhöndlaðar með prófunarefninu í 3–6 klst. með og án S9. Meðhöndlunarætið er fjarlægt og í staðinn sett nýtt æti sem inniheldur sýtókalasín-B og frumurnar eru heimtar 1,5–2,0 eðlilegum frumuhringjum síðar.
42. Ef báðar upphafspröfanir með stuttu meðhöndluninni (3–6 klst.) eru neikvæðar eða tvíræðar er þeim fylgt eftir með framlengdri váhrifameðhöndlun án notkunar á S9. Tveir valkostir við meðhöndlun eru fyrir hendi og eru jafnásættanlegir. Þó gæti átt betur við að velja valkost A ef um er að ræða örvaðar eitilfrumur þar eð dregið getur úr veldisvexti þeirra 96 klst. eftir örvunina. Auk þess skulu frumuræktir ekki hafa náð að renna saman þegar lokasýnið er tekið samkvæmt valkosti B.
- Valkostur A: Frumurnar eru meðhöndlaðar með prófunarefninu í 1,5–2,0 eðlilega frumuhringi og heimtar við lok meðhöndlunartímans.
 - Valkostur B: Frumurnar eru meðhöndlaðar með prófunarefninu í 1,5–2,0 eðlilega frumuhringi. Meðhöndlunarætið er fjarlægt og í staðinn sett nýtt æti og frumurnar heimtar eftir 1,5–2,0 eðlilega frumuhringi til viðbótar.
43. Fyrsta stigs frumur og frumulínur skal meðhöndla á samsvarandi hátt og eitilfrumur nema að því leyti að ekki þarf að örva þær með fýtóhemaglútíníni í 44–48 klst. Váhrifum á aðrar frumur en eitilfrumur skal haga þannig að frumurnar séu enn í veldisvaxtarfasa þegar rannsókninni lýkur.

Frumulínur án sýtókalasíns-B

44. Frumurnar skulu meðhöndlaðar í 3–6 tíma með og án S9. Meðhöndlunarætið er fjarlæggt og í staðinn sett nýtt æti og frumurnar heimtar 1,5–2,0 eðlilegum frumuhringjum síðar.
45. Ef báðar upphafsprófanirnar með stuttu meðhöndluninni (3–6 klst.) eru neikvæðar eða tvíræðar er þeim fylgt eftir með framlengdri váhrifameðhöndlun (án notkunar á S9). Tveir valkostir við meðhöndlun eru fyrir hendi og eru báðir jafnásættanlegir.
 - Valkostur A: Frumurnar eru meðhöndlaðar með prófunarefninu í 1,5–2,0 eðlilega frumuhringi og heimtar við lok meðhöndlunartímans.
 - Valkostur B: Frumurnar eru meðhöndlaðar með prófunarefninu í 1,5–2,0 eðlilega frumuhringi. Meðhöndlunarætið er fjarlæggt og í staðinn sett nýtt æti og frumurnar heimtar eftir 1,5–2,0 eðlilega frumuhringi til viðbótar.
46. Frumur í jafnskiptingu (mítósu) (þekkjust á því að þær eru hringlaga og losa sig frá yfirborðinu) geta verið til staðar í einlögum við lok 3–6 klst. meðhöndlunarinnar. Þar eð þessar frumur í jafnskiptingu losna auðveldlega geta þær glatast þegar ætið með prófunarefninu er fjarlæggt. Þess skal gætt að safna þeim saman, þegar ætið er hreinsað, og setja þær aftur í ræktirnar til að glata ekki frumum sem eru í mítósu, og í áhættu með tilliti til myndunar smákjarna, þegar frumur eru heimtar.

Fjöldi rækta

47. Nota skal tvær eins ræktir fyrir hvern styrk prófunarefnis, fyrir ræktirnar með burðarefni eða leysi og fyrir neikvæða samanburðinn. Ef unnt er, á grundvelli rannsóknarsögulegra gagna rannsóknarstofunnar, að sýna fram á að breytileiki milli ræktanna tveggja sé í lágmarki getur verið ásættanlegt að nota stakar ræktir. Ef stakar ræktir eru notaðar er mælt með því að greina fleiri styrkleika.

Heimt frumna og undirbúningur sýnisglerja

48. Hver rækt er heimt og unnin sér. Undirbúningur frumna getur falið í sér meðhöndlun í undirþrýstinni lausn en það stig er ekki nauðsynlegt ef fullnægjandi dreifing frumna næst með öðrum hætti. Nota má mismunandi aðferðir við undirbúning sýnisglerja, að því tilskildu að með þeim náist frumusýni af háum gæðum til talningar. Umfrými frumnanna skal haldið eftir til að unnt sé að greina smákjarna og (ef notuð er hindrun á umfrymisskiptingu) greina tvíkjarna frumur á áreiðanlegan hátt.
49. Hægt er að lita sýnisglerin með mismunandi aðferðum, s.s. Giemsa-litun eða litun með DNA-sértækum flúrlitum (59. heimild). Ef DNA-sértækir litir (t.d. akridinappelsínugult (61. heimild) eða Hoechst 33258 með pýróníni-Y (62. heimild)) eru notaðir má komast hjá sumum gervingum sem komið geta fram ef notaðir eru litir sem eru ekki DNA-sértækir. Nota má þráðhaldsmótefni (e. *anti-kinetochore antibodies*), FISH-aðferð með þráðhaftspreifara sem nær yfir allt þráðhaftið (e. *FISH with pancentromeric DNA probes*) eða staðbundna merkingu með sértækum þráðhaftsvisum sem nær yfir allt þráðhaftið (e. *primed in situ labelling with pancentromere-specific primers*), ásamt viðeigandi DNA andstæðulitun/mótlitun til að greina innihald smákjarna (litninga/litningabrot) ef upplýsingar um gangvirkið í myndun þeirra eru gagnlegar (15. og 16. heimild). Nota má aðrar aðferðir til að greina á milli efna sem valda litningaskemmdum og efna sem valda mislitun ef sýnt hefur verið fram á að þær séu árangursríkar.

Greining

50. Öll sýnisgler, þ.m.t. með sýnum með leysi eða burðarefni og samanburðariðefnunum, skulu kóðuð hvert um sig áður en kemur að smásjárgreiningu. Einnig er hægt að greina kóðuð sýni með því að nota fullgilt, sjálfvirkt frumufldæðissjárkerfi eða myndgreiningarkerfi.
51. Í ræktum, sem eru meðhöndlaðar með sýtókalasíni-B, skal greina tíðni smákjarna í a.m.k. 2000 tvíkjarna frumum í hverjum styrkleika (a.m.k. 1000 tvíkjarnafrumur í hverri rækt og tvær ræktir í hverjum styrkleika). Ef notaðar eru stakar ræktir skal telja í a.m.k. 2000 tvíkjarna frumum í hverjum styrkleika úr þannig rækt. Ef tiltækar, tvíkjarna frumur til talningar í hverjum styrk í hverri ræktun eru miklu færri en 1000, eða færri en 2000 ef notuð er stök rækt, og ef ekki greinist umtalsverð aukning á smákjörnum skal prófunin endurtekin og notaðar fleiri frumur eða styrkleikar sem hafa minni eiturhrif, hvort sem betur á við. Þess skal gætt að telja ekki tvíkjarna frumur sem hafa óreglulega lögun eða ef mikill stærðarmunur er á kjörnunum tveimur í þeim og ekki skal tvíkjarna frumum heldur ruglað saman við illa dreifðar, fjölkjarna frumur. Frumur, sem innihalda fleiri en tvo kjarna, skal ekki greina með tilliti til smákjarna þar eð grunn tíðni smákjarna (e. *baseline micronucleus frequency*) getur verið hærri í þeim frumum (63. og 64. heimild). Talning í einkkjarna frumum er ásættanleg ef sýnt er fram á að prófunarefnið trufli virkni sýtókalasíns-B.

52. Í frumulínum, sem eru prófaðar án meðhöndlunar með sýtókalasíni-B, skal telja smákjarna í a.m.k. 2000 frumum í hverjum styrkleika (a.m.k. 1000 frumur í hverri rækt og tvær ræktir í hverjum styrkleika). Ef aðeins er notuð ein rækt í hverjum styrkleika skal telja í a.m.k. 2000 frumum úr þeirri rækt.
53. Ef notað er sýtókalasín-B skal ákvarða fjölgunarstuðul fyrir frumur, sem skipting umfrymis hefur verið hindruð í, eða eftirmyndunarstuðul til að meta frumufjölgun (sjá 2. viðbæti) með a.m.k. 500 frumum í hverri rækt. Við meðhöndlun án þess að bæta sýtókalasíni-B við er nauðsynlegt að færa sönnur á að frumurnar, sem talið er í, hafi fjölgað sér, eins og rætt er í 24.–27. mgr.

Viðmiðanir fyrir ásættanleika

54. Rannsóknarstofan, sem hyggst nota smákjarnaprófunina í glasi sem er lýst í þessari prófunaraðferð, skal sýna fram á getu sína til að greina áreiðanlega og nákvæmlega íðefni sem hafa þekkt mislitnunar- og litningaskemmdavirkni, með og án efnaskiptavirkjunar, sem og þekkt, neikvæð íðefni og nota til þess viðmiðunariðefnin í 3. viðbæti. Til að sanna getu sína til að nota þessa prófunaraðferð rétt skal rannsóknarstofan leggja fram gögn um að frumurnar, sem smákjarnamyndun er greind í, hafi lokið einni kjarnaskiptingu, ef prófunin er gerð án þess að nota sýtókalasín-B.
55. Ráðlagt er að nota íðefnin í 3. viðbæti sem viðmiðunariðefni. Hægt er að hafa staðgönguíðefni eða viðbótariðefni með ef virkni þeirra er þekkt og ef þau framkalla smákjarna með sömu gangvirkjum og ef sýnt er fram á að þau skipti máli vegna íðefnanna sem verða prófuð með smákjarnaprófun í glasi. Rökstuðningur gæti falið í sér fullgildingarrannsókn þar sem notað er fjölbreytt úrval efna eða sem er beint að þrengra sviði sem miðast við íðefnaflokk prófunarefnisins eða gangvirki skemmdanna sem verið er að rannsaka.
56. Samanburður með leysi eða burðarefni og ómeðhöndlaðar ræktir eiga að veita samanburðarnákvæma, lága og samkvæma tíðni smákjarna (dæmigert er 5–25 smákjarnar í hverjum 1000 frumum fyrir þær frumugerðir sem eru tilteknar í 11. mgr.). Aðrar frumugerðir geta haft öðruvísi svörunarsvið sem skal ákvarða þegar þær eru fullgiltar til notkunar í smákjarnaprófuninni í glasi. Gögn úr samanburði með neikvæðum efnum, leysi og jákvæðum efnum skulu notuð til að ákvarða rannsóknarsöguleg svið fyrir samanburðinn. Nota skal þessi gildi til að ákveða hvort samskeiða, jákvæði og neikvæði samanburðurinn er fullnægjandi til notkunar í rannsókn.
57. Ef lagðar eru til minniháttar breytingar á aðferðarlýsingu fyrir prófunina (t.d. notkun sjálfvirkir tækni við talningu í stað handvirkir eða notkun nýrrar frumugerðar) skal sýna fram á árangur af breytingunni áður en litið er svo á að notkun breyttu aðferðarlýsingarinnar sé ásættanleg. Þegar sýnt er fram á árangur felur það í sér að sýna fram á að hægt sé að greina mikilvægustu gangvirki litningarofs og litningafjölgunar eða -fækkunar og að hægt sé að ná jákvæðum og neikvæðum niðurstöðum sem eru viðeigandi fyrir flokk hvers efnis, eða fyrir breitt svið efna, sem prófa skal.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Úrvinnsla niðurstaðna

58. Ef sú aðferð er notuð að hindra frymisskiptingu skal aðeins nota tíðni tvíkjarna frumna með smákjörnum (óháð fjölda smákjarna í hverri frumu) við mat á framköllun smákjarna. Greining á fjölda frumna með einn, tvo eða fleiri smákjarna getur veitt gagnlegar upplýsingar en er ekki skyldubundin.
59. Ákvarða skal samskeiða mælingar á frumueiturhrifum og/eða frumuhamningu í öllum meðhöndluðum ræktum og samanburðarræktum með leysi eða burðarefni (58. heimild). Reikna skal út fjölgunarstuðul fyrir frumur, sem skipting umfrymis hefur verið hindruð í, og eftirmyndunarstuðul fyrir allar meðhöndlaðar ræktir og samanburðarræktir til að mæla tölfræði frumuhring þegar notuð er sú aðferð að hindra frymisskiptingu. Ef ekki er notað sýtókalasín-B skal nota hlutfallslega tvöföldun hóps eða hlutfallslega aukningu frumufjölda eða fjölgunarstuðul (sjá 2. viðbæti).
60. Skrá skal sérstaklega gögn um hverja rækt. Auk þess skal taka öll gögn saman í töflu.
61. Íðefni, sem framkalla smákjarna í smákjarnaprófuninni í glasi, geta gert það af því þau framkalla litningarof, litningafækkun eða samsetningu af þessu tvennu. Gera má frekari greiningu með notkun þráðhaldsmótefna, staðbundinna þráðhaftssértækra þreifara eða öðrum aðferðum til að ákvarða hvort gangvirkið sem framkallar smákjarna sé vegna litningaskemmda- eða mislitnunarvirkni.

Mat og túlkun á niðurstöðum

62. Ekki er gerð krafa um sannprófun á skýrri, jákvæðri eða neikvæðri svörun með viðbótarprófunum. Unnt er að gera tvíráðar niðurstöður skýrari með því að greina 1000 frumur til viðbótar úr öllum ræktunum til að blindunin í rannsókninni glatist ekki. Ef þessi aðferð gefur ekki ljósar niðurstöður skal gera frekari prófanir. Í eftirfylgnitilraunum skal meta hvort breyta skuli mæliþáttum rannsóknarinnar til að vikka svið aðstæðnanna eða þrengja það, eins og við á. Meðal mæliþátta í rannsókninni, sem kemur til álita að breyta, er bilið milli mismunandi prófunarstyrkleika, tímasetning meðhöndlunar og frumuheimtar og/eða aðstæðurnar við efnaskiptavirkjunina.

63. Allmargar viðmiðanir eru notaðar til að ákvarða jákvæða niðurstöðu, s.s. styrktengd aukning eða tölfræðilega marktæk aukning á fjölda frumna sem innihalda smákjarna. Fyrst skal meta líffræðilegt gildi niðurstaðnanna. Athugun á því hvort mæld gildi eru innan eða utan rannsóknarsögulegs sviðs fyrir samanburðinn getur verið til leiðbeiningar við mat á líffræðilegu mikilvægi svörunarinnar. Heimilt er að beita videigandi, tölfræðilegum aðferðum til að auðvelda mat á niðurstöðum úr prófun (65. heimild). Niðurstöður tölfræðilegra prófana skulu þó metnar með tilliti til tengslanna milli skammts og svörunar. Einnig skal taka tillit til samanburðarnákvæmni og rannsóknarsögulegra gagna.
64. Þótt niðurstöður úr flestum tilraunum séu annaðhvort ótvírætt jákvæðar eða neikvæðar geta gögnin í sumum tilvikum komið í veg fyrir að afdráttarlaus úrskurður fáiast um virkni prófunarefnisins. Þessar tvíræðu eða vafasömu niðurstöður geta komið fram hversu oft sem tilraunin er endurtekin.
65. Jákvæðar niðurstöður úr smákjarnaprófun í glasi benda til að prófunarefnið framkalli litningarof eða litningafækkun í ræktuðum spendýrafrumum. Neikvæðar niðurstöður benda til þess að við prófunaraðstæður framkalli prófunarefnið ekki litningarof og/eða fjölgun eða fækkun litninga í ræktuðum spendýrafrumum.

Prófunarskýrsla

66. Prófunarskýrslan skal a.m.k. innihalda eftirfarandi upplýsingar ef þær skipta máli fyrir framkvæmd rannsóknarinnar:

Prófunarefni:

- auðkennissögn, skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um iðefni (e. *Chemical Abstract Services (CAS)*) og EB-númer,
- eðliseiginleikar og hreinleiki,
- eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem tengjast framkvæmd rannsóknarinnar,
- hvarfgirni prófunaríðefnisins við leysinn eða burðarefnið eða frumuræktarætið.

Leysir og burðarefni:

- rök fyrir vali á leysi eða burðarefni,
- leysni og stöðugleiki prófunarefnisins í leysinum eða burðarefninu.

Frumur:

- gerð og uppruni frumna sem eru notaðar,
- hæfi þeirrar frumugerðar sem er notuð,
- það að frurnar eru ekki smitaðar berfrymingum, ef við á,
- upplýsingar um lengd frumhrings, tvöföldunartíma eða fjölgunarstuðul,
- ef eitilfrumur eru notaðar: kyn, aldur og fjöldi blóðgjafa ef við á,
- ef eitilfrumur eru notaðar: hvort heilblóð eða stakar eitilfrumur eru láttnar verða fyrir váhrifum,
- fjöldi umsánings ef við á,
- aðferðir til að viðhalda frumuræktum ef við á,
- eðlilegur fjöldi litninga,
- eðlileg lengd frumhrings (neikvæður samanburður).

Prófunaraðstæður:

- auðkenni efnis sem er notað til að hindra umfrymisskiptingu (t.d. sýtókalasín-B), ef það er notað, og styrkur þess og lengd váhrifa þeirra á frumurnar,
- rök fyrir vali á þeim styrkleikum og fjölda rækta sem eru notuð, þ.m.t. gögn um frumueiturhrif og takmarkanir á leysni, ef þau eru tiltæk.

- samsetning ætis og styrkur CO₂ ef við á,
- styrkur prófunarefnisins,
- styrkur (og/eða rúmmál) burðarefnis og prófunarefnis sem er bætt við,
- hitastigið sem sýnið er látið standa við og hve lengi,
- lengd meðhöndlunar,
- hvenær frumur eru heimtar eftir meðhöndlun,
- frumuþéttleiki við sáningu ef við á,
- tegund og samsetning efnaskiptavirkjunarkerfis, m.a. viðmiðanir fyrir ásættanleika,
- jákvæð samanburðaríðefni og neikvæður samanburður,
- aðferðir við undirbúning sýnisglertja og tæknin sem er notuð við litun,
- viðmiðanir fyrir greiningu á smákjörnum,
- fjöldi frumna sem eru greindar,
- aðferðir við mælingar á frumueiturhrifum,
- allar viðbótarupplýsingar sem skipta máli varðandi frumueiturhrif,
- viðmiðanir til að meta hvort niðurstöður rannsókna séu jákvæðar, neikvæðar eða tvíræðar,
- aðferð eða aðferðir sem eru notaðar við tölfræðilega greiningu,
- aðferðir, s.s. notkun þráðhaldsmótefna, til að ákvarða hvort smákjarnar innihalda heila eða brotna litninga, ef við á.

Niðurstöður:

- mælingar á frumueiturhrifum, t.d. fjölgunarstuðull fyrir frumur, sem skipting umfrymis hefur verið hindruð í, eða eftirmyndunarstuðull, ef um er að ræða aðferð þar sem notuð er hindrun á umfrymisskiptingu, hlutfallsleg aukning frumufjölda, hlutfallsleg tvöföldun hóps eða fjölgunarstuðull ef ekki er notuð hindrun á umfrymisskiptingu eða aðrar mælingar þar sem það á við, t.d. samrennsli frumna, stýrður frumudauði, drep, miðfasatalning, tíðni tvíkjarna frumna,
- merki um útfellingu,
- gögn um sýrustig og osmólalstyrk í meðhöndlunarætinu ef þessir þættir eru mældir,
- skilgreining á frumum sem eru ásættanlegar til greiningar,
- dreifing ein-, tví- og fjölkjarna frumna ef notuð er sú aðferð að hindra umfrymisskiptingu,
- fjöldi frumna sem smákjarnar finnast í, gefinn upp fyrir hverja meðhöndlaða rækt og hverja samanburðarrækt og tiltekið hvort það eru ein- eða tvíkjarnafrumur, eftir því sem við á,
- tengsl milli styrks og svörunar, ef unnt er,
- efnafraeðileg gögn um samskeiða, neikvæðan (leysir eða burðarefni) og jákvæðan samanburð (styrkleikar og leysar),
- rannsóknarsöguleg, efnafraeðileg gögn um neikvæðan (leysir eða burðarefni) og jákvæðan samanburð, ásamt sviðum, meðaltölum og staðalfrávikum og öryggisbili (t.d. 95%),
- tölfræðilegar greiningar, p-gildi ef þau liggja fyrir.

Umfjöllun um niðurstöðurnar

Niðurstöður

HEIMILDIR

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

- 18) Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G. and Marzin, D. (2006), SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, *Mutation Res.*, 607, 13-36.
- 19) Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes, *Mutation Res.*, 607, 37-60.
- 20) Aardema, M.J., Snyder, R.D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R.J., Gibson, D.P., Soelter, S., Curry, P.T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells, *Mutation Res.*, 607, 61-87.
- 21) Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senjyu, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, *Mutation Res.*, 607, 88-124.
- 22) Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells, *Mutation Res.*, 607, 125-152.
- 23) Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A.A. and Locher, F. (1997), Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 187-208.
- 24) Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. and Lorge, E. (1997), Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 45-59.
- 25) Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. and Madle, S. (1998), Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Res.*, 410, 81-116.
- 26) Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. and Madle, S. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells — comparison of three different test approaches, *Mutation Res.* 439, 183-190.
- 27) Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S.Y., Kasper, P. and Müller, L. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutation Res.* 445, 55-71.
- 28) von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H.G., Honarvar, N., Fahrig, R., 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. ESAC 25th meeting, 16-17 November, 2006, aðgengilegt á: [<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, Available at: [<http://ecvam.jrc.it/index.htm>]

- 34) Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S., van Benthem, J., Vanparrys 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 genotoxicants; current state of knowledge, *Toxicol.*, 198, 315-328.
- 38) Gibson, D.P., Brauninger, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. and Aardema, M.J. (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, *Mutation Res.*, 392, 61-70.
- 39) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, 147-205.
- 40) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 268, 297-305.
- 41) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environ. Mutagen.*, 8, 789-886.
- 42) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Res.*, 147, 29-36.
- 43) Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, *Mutation Res.*, 392, 11-18.
- 44) Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. (2001), HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, *Environ. Mol. Mutagen.* 37, 31-45.
- 45) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215.
- 46) Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C.R. and Zeiger, E. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55-65.
- 47) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.
- 48) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, *In: de Serres, F.J., Fouts, J. R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, 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), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Aðgengilegt á: [<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 McCooley, 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) Pincú, 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) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 850/2004 frá 29. apríl 2004 um þrávirk, lífræn mengunarefni og um breytingu á tilskipun 79/117/EBE, Stjórn ESB L 229, 30.4.2004 bls. 5.

*I. viðbætur***Skilgreiningar**

Efni sem veldur mislitnun: öll efni eða ferli sem hafa í för með sér mislitnun í frumum eða lífverum með því að víxlverka á þætti á jafnskiptingar- og rýriskiptingarstigi frumuskiptingar.

Mislitnun: öll frávik frá eðlilegum fjölda tvílitna (eða einlitna) litninga ef um er að ræða einn eða fleiri litninga en ekki ef um er að ræða heilt sett eða heil sett litninga (fjöllitnun).

Stýrður frumudauði: frumudauði sem er stýrt og einkennist af röð þrepa sem leiða til sundrunar frumna í agnir sem bindast himnunni og er síðan eytt með agnaáti eða með losun.

Fjölgun frumna: aukinn fjöldi vegna frumna í jafnskiptingu.

Þráðhaft: DNA-hluti litnings þar sem báðir litningsþræðir eru fastir saman og þar sem bæði þráðhöldin eru fest hlið við hlið.

Efni sem veldur litningaskemmdum: öll efni eða ferli sem valda gerðarbreytingum í frumuhópum eða hópum lífvera.

Umfrýmisskipting: frumuskipting sem verður strax að lokinni mítósu til að mynda tvær dótturfrumur, hvora um sig með einn kjarna.

Fjölgunarstuðull fyrir frumur sem skipting umfrýmis hefur verið hindruð í (e. Cytokinesis-Block Proliferation index (CBPI)): hlutfallið milli frumna í meðhöndlaða hópnum, sem hafa skipt sér tvisvar, og í samanburðinum sem fékk ekki meðhöndlun (sjá formúlu í 2. viðbæti).

Frumuhamning (cytostasis): hömlun á frumuvexti (sjá formúlu í 2. viðbæti).

Frumueiturhrif: skaðleg áhrif á byggingu eða virkni frumunnar sem hafa að lokum í för með sér dauða hennar.

Efni sem hefur erfðaeiturhrif: almennt hugtak sem nær yfir allar gerðir skaða á DNA eða litningum, þ.m.t. rof, viðbætur, endurröðun, stökkbreytingar, litningabreytingar og mislitnun. Erfðaeiturhrif hafa ekki öll í för með sér stökkbreytingar eða stöðugar litningaskemmdir.

Frumur í millifasa frumur sem eru ekki á jafnskiptingarstigi.

Þráðhald: prótínírk efnisskipan sem safnast saman við þráðhaft á litningi þar sem spólþræðir festast meðan á frumuskiptingu stendur og það gerir dótturlitningunum kleift að færast skipulega að skautum dótturfrumnanna.

Smákjarnar: smágerðir aukakjarnar sem eru aðskildir frá meginkjörnum frumnanna og myndast í lokafasa jafnskiptingar eða rýriskiptingar út frá litningabrotum eða heilum litningum sem sitja eftir.

Mítósa: skipting frumkjarnans sem skiptist oftast í forfasa, formiðfasa, miðfasa, síðfasa og lokafasa.

Jafnskiptingarstuðull (e. mitotic index): hlutfallið milli fjölda frumna í miðfasa og mælds heildarfjölda frumna í frumuhópi; vísending um hve ör fjölgunin er í þeim frumuhóp.

Stökkbreytandi: veldur arfgengri breytingu á röð eða röðum DNA-basapara í litningum eða breytingu á byggingu litninga (litningabreytingu).

Aðskilnaður verður ekki (e. non-disjunction): paraðir litningsþræðir losna ekki í sundur og aðskiljast ekki rétt til dótturfrumnanna sem eru að verða til og það hefur í för með sér að dótturfrumurnar hafa afbrigðilegan fjölda litninga.

Fjöllitnun: breytingar á litningafjölda í heilu setti eða settum litninga í frumum eða lífverum í stað staks litnings eða stakra litninga (mislitnun).

Fjölgunarstuðull (e. Proliferation Index (PI)): aðferð til að mæla frumueiturhrif ef sýtókalasín-B er ekki notað (sjá formúlu í 2. viðbæti).

Hlutfallsleg aukning frumufjölda: aðferð til að mæla frumueiturhrif ef sýtókalasín-B er ekki notað (sjá formúlu í 2. viðbæti).

Hlutfallsleg tvöföldun hóps: aðferð til að mæla frumueiturhrif ef sýtókalasín-B er ekki notað (sjá formúlu í 2. viðbæti).

Eftirmyndunarstuðull: hlutfallið milli fjölda frumuskiptingarhringja, sem hefur verið lokið að fullu í meðhöndlaðri rækt, og fjölda þeirra í ómeðhöndlaðri samanburðarrækt, meðan á váhrifatímabilinu og afturbata stendur (sjá formúlu í 2. viðbæti).

Prófunarefni: Sérhvert efni og blanda sem eru prófuð með þessari prófunaraðferð.

2. viðbætur

Formúlur fyrir mat á frumueiturhrifum

1. Ef sýtókalasín-B er notað skal mat á frumueiturhrifum byggjast á fjölgunarstuðli fyrir frumur, sem skipting umfrymis hefur verið hindruð í („CBPI“ í formúlunum hér á eftir), eða eftirmyndunarstuðli („RI“ í formúlunum hér á eftir) (16. og 58. heimild). Fjölgunarstuðullinn fyrir frumur, sem skipting umfrymis hefur verið hindruð í, gefur til kynna meðalfjölda frumuhringja hverrar frumu meðan hún verður fyrir váhrifum frá sýtókalasíni-B og hægt er að nota hann til að reikna út frumufjölgun. Eftirmyndunarstuðull gefur til kynna hlutfallslegan fjölda kjarna í meðhöndluðum ræktum í samanburði við samanburðarræktir og hægt er að nota hann til að reikna út hundraðshlutfall frumuhamningar.

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

og

T = rækt meðhöndluð með prófunariðefni

C = samanburðarrækt með burðarefni

þar sem:

$$CBPI = \frac{((\text{fjöldi einkjarna frumna}) + (2 \times \text{fjöldi tvíkjarna frumna}) + (3 \times \text{fjöldi fjölkjarna frumna}))}{(\text{heildarfjöldi frumna})}$$

CBPI-gildið 1 (allar frumur eru einkjarna) jafngildir 100% frumuhamningu.

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

$$RI = \frac{((\text{fjöldi tvíkjarna frumna}) + (2 \times \text{fjöldi fjölkjarna frumna})) \div (\text{heildarfjöldi frumna})_T}{((\text{fjöldi tvíkjarna frumna}) + (2 \times \text{fjöldi fjölkjarna frumna})) \div (\text{heildarfjöldi frumna})_C} \times 100$$

T = meðhöndlaðar ræktir

C = samanburðarræktir

2. 53% eftirmyndunarstuðull merkir því að samanborið við fjölda frumna, sem hafa skipt sér og myndað tvíkjarna og fjölkjarna frumur í samanburðarræktinni, hafa aðeins 53% af þeim fjölda skipt sér í meðhöndluðu ræktinni, þ.e. 47% frumuhamning.

3. Ef sýtókalasín-B er ekki notað er mælt með því að mat á frumueiturhrifum sé byggt á hlutfallslegri aukningu frumufjölda („RICC“ í formúlum hér á eftir) eða á hlutfallslegri tvöföldun hóps („RPD“ í formúlum hér á eftir) þar eð báðar aðferðirnar taka tillit til þess hlutfalls frumuhópsins sem hefur skipt sér.

$$RICC = \frac{(\text{aukinn fjöldi frumna í meðhöndluðum ræktum (við lok - við upphaf)})}{(\text{aukinn fjöldi frumna í samanburðarræktum (við lok - við upphaf)})} \times 100$$

$$RPD = \frac{(\text{fjöldi hópa sem tvöfaldast í meðhöndluðum ræktum})}{(\text{fjöldi hópa sem tvöfaldast í samanburðarræktum})} \times 100$$

þar sem:

tvöföldun hópa = $[\log(\text{frumufjöldi eftir meðhöndlun} \div \text{upphaflegur frumufjöldi})] \div \log 2$

4. Því bendir 53% RICC- eða RPD-gildi til 47% frumueiturhrifa/frumuhamningar.

5. Hægt er að nota fjölgunarstuðul (PI) í formúlum hér á eftir við mat á frumueiturhrifum með því að telja klóna sem samanstanda af einni frumu (c1) tveimur frumum (c2) þremur til fjórum frumum (c4) og 5–8 frumum (c8)

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

6. Fjölgunarstuðull hefur einnig verið notaður sem gagnlegur og áreiðanlegur mælipáttur fyrir frumulínur sem eru ræktaðar á staðnum án viðbættis sýtókalasíns-B (25.–28. heimild).

3. viðbætur

Ráðlögð viðmiðunariðefni fyrir mat á nothæfi ⁽¹⁾

Flokkur	Íðefni	CAS-nr.	EB-nr.
1. Efni sem valda litningaskemmdum og eru virk án efnaskiptavirkjunar			
	Sýtósínarabínósíð	147-94-4	205-705-9
	Mítómýsín C	50-07-7	200-008-6
2. Efni sem valda litningaskemmdum og þarfnast efnaskiptavirkjunar			
	Bensó(a)þýren	50-32-8	200-028-5
	Sýklófosfamíð	50-18-0	200-015-4
3. Efni sem valda mislitnun			
	Kolsísín	64-86-8	200-598-5
	Vínblastín	143-67-9	205-606-0
4. Neikvæð efni			
	dí(2-etylhexýl)þalat	117-81-7	204-211-0
	Nalidixínsýra	389-08-2	206-864-7
	Þýren	129-00-0	204-927-3
	Natríumklóríð	7647-14-5	231-598-3

(¹) Viðmiðunariðefnin eru þau íðefni sem mælt er með að séu notuð. Hægt er að skipta út íðefnum í skránni yfir viðmiðunariðefnin eða bæta þeim við skrána ef virkni þeirra er þekkt og ef þau framkalla smákjarna með sömu gangvirkjum og ef sýnt er fram á að þau skipti máli vegna íðefnanna sem verða prófuð með smákjarnaprófun í glasi. Eftir því hvert tilefnið er gæti rökstuðningur einnig falið í sér fullgildingarrannsókn þar sem notað er fjölbreytt úrval efna eða sem er beint að þrengra sviði sem miðast við íðefnaflokk prófunarefnisins eða gangvirki skemmdanna sem verið er að rannsaka.

B.50 HÚÐNÆMING: DA-EITLAGREINING

INNGANGUR

- Viðmiðunarreglur Efnahags- og framfarastofnunarinnar um prófun íðefna og prófunaraðferðir ESB eru endurskoðaðar reglulega með hliðsjón af framþróun í vísindum, þörfum á nýrri löggjöf og sjónarmiðum er varða velferð dýra. Fyrsta prófunaraðferðin (B.42) til að ákvarða húðnæmingu hjá músum, eitlagreining (e. *Local Lymph Node Assay* (LLNA)) (OECD-viðmiðunarregla 429 um prófanir), hefur verið endurskoðuð (1. heimild). Upplýsingar um fullgildingu eitlagreiningar og yfirlit yfir það starf, sem tengist henni, hafa verið birtar (2.–9. heimild). Í eitlagreiningunni er notuð geislavirk samsæta af týmidíni eða jodí til að mæla fjölgun eitilfrumna og því eru takmörkuð not af greiningunni þegar öflun á geislavirkni, notkun hennar eða förgun er erfið. DA-eitlagreining (LLNA: DA) (þróuð hjá Daicel Chemical Industries, Ltd) er ógeislavirk breyting á eitlagreiningu þar sem innihald af adenósínþrífosfötum (hér á eftir „ATP“) er magngreint með því að nota líffjómum sem vísi um eitilfrumnafjölgun. Alþjóðlegur ritrýnihópur hefur fullgilt og yfirfarið DA-eitlagreiningaraðferðina við prófun og mælir með henni sem gagnlegri til greiningar, með tilteknum takmörkunum, á húðnæmandi íðefnum og íðefnum sem eru ekki húðnæmandi (10.–13. heimild). Þessi prófunaraðferð er hönnuð til að meta húðnæmingarmátt íðefna (efna og blandna) hjá dýrum. Samkvæmt kafla B.6 í þessum viðauka og OECD-viðmiðunarreglu 406 um prófanir eru notaðar prófanir á naggrísnum, einkum hámarkunarpófun á naggrísnum og Buehlers-prófun (14. heimild). Eitlagreiningin (kafla B.42 í þessum viðauka, OECD-viðmiðunarregla 429 um prófanir) og ógeislavirku, breyttu aðferðirnar tvær, DA-eitlagreining (kafla B.50 í þessum viðauka, OECD-viðmiðunarregla 442 A um prófanir) og BRdU-ELISA-eitlagreining (kafla B.51 í þessum viðauka, OECD-viðmiðunarregla 442 B um prófanir) eru allar fremri prófununum á naggrísnum í B.6 og OECD-viðmiðunarreglu 406 um prófanir (14. heimild) að því leyti að með þeim er dregið úr notkun á dýrum og hún milduð.
- Líkt og eitlagreining er DA-eitlagreining notuð til að rannsaka örvunarfasa húðnæmingar og veita meginlegar upplýsingar sem henta til að meta skammtasvörum. Auk þess kemur getan til að greina húðnæma, án þess að þurfa að nota geislamerkingu fyrir DNA, í veg fyrir hættu á váhrifum frá geislavirkni í starfi og vandamál vegna förgunar úrgangs. Það gæti gert kleift að nota í auknum mæli mýs til að greina húðnæma en það myndi draga enn frekar úr notkun naggrísa í prófunum á húðnæmingarmætti (B.6, OECD-viðmiðunarregla 406 um prófanir) (14. heimild).

SKILGREININGAR

- Skilgreiningar, sem eru notaðar, eru gefnar upp í 1. viðbæti.

ATRÍÐI, SEM ÞARF AÐ HAFI Í HUGA Í UPPHAFI, OG TAKMARKANIR

4. DA-eitlagreining er breyting á eitlagreiningu og ætluð til að greina, með tilteknum takmörkunum, íðefni sem kunna að vera næmandi. Þetta þýðir ekki endilega að alltaf skuli nota DA-eitlagreiningu í stað eitlagreiningar eða prófunar á naggrísnum (B.6, OECD-viðmiðunarregla 406 um prófanir) (14. heimild) heldur að greiningin sé jafngild og að hana megi nota sem staðgönguáðferð í tilvikum þar sem jákvæðar eða neikvæðar niðurstöður þurfa að jafnaði ekki frekari staðfestingar við (10. og 11. heimild). Prófunarstofan skal skoða allar fánlegar upplýsingar um prófunarefnið áður en rannsókn hefst. Meðal slíkra upplýsinga eru auðkenni og efnafræðileg bygging prófunarefnisins, eðlisefnafræðilegir eiginleikar þess, niðurstöður úr öllum öðrum eiturhrifaprófunum á prófunarefninu í glasi og í lífi og eiturefnafræðileg gögn um efni með skylda byggingu. Þessar upplýsingar skulu skoðaðar í því skyni að ákvarða hvort DA-eitlagreining sé viðeigandi fyrir prófunarefnið (með hliðsjón af því að ekki er unnt að nota DA-eitlagreininguna fyrir tilteknar tegundir íðefna (sjá 5. mgr.)) og til að auðvelda val á skömmtum
5. DA-eitlagreining er áðferð til greiningar í lífi og þar af leiðandi útilokar hún ekki að dýr séu notuð við mat á næmingu fyrir snertiofnæmi. Hún gefur þó færi á að fækka dýrunum, sem nota þarf í þessum tilgangi, í samanburði við naggrísprófanir (B.6, OECD-viðmiðunarregla 406 um prófanir) (14. heimild). Auk þess býður DA-eitlagreining upp á verulega framför í meðferð dýra við prófanir á næmingu fyrir snertiofnæmi (minni sársauka og þjáningu) því að við DA-eitlagreiningu er ekki þörf á að kalla fram áreitisörvaða ofurnæmissvörun í húð, ólíkt B.6 og OECD-viðmiðunarreglu 406 fyrir prófanir. Þrátt fyrir þá kosti sem DA-eitlagreining hefur framyfir B.6 og OECD-viðmiðunarreglu 406 um prófanir (14. heimild) hefur hún vissar takmarkanir sem geta gert það nauðsynlegt að nota B.6 eða OECD-viðmiðunarreglu 406 um prófanir (t.d. vegna prófana á tilteknum málum, falsjákvæðra niðurstaðna fyrir tiltekin húðertingarefni, s.s. sum yfirborðsvirk efni (6. heimild) (1. heimild og kafli B.42 í þessum viðauka) og leysni prófunarefnisins). Auk þess getur verið nauðsynlegt að nota prófanir á naggrísnum (B.6, OECD-viðmiðunarregla 406 um prófanir (14. heimild)) þegar um er að ræða íðefnaflokkka eða efni sem innihalda virka hópa sem sýnt hefur verið fram á að geti verið truflandi þættir (16. heimild) Mælt er með því að þær takmarkanir eitlagreiningarinnar, sem komið hafa í ljós (1. heimild og kafli B.42 í þessum viðauka), séu einnig látnar gilda um DA-eitlagreiningu (10. heimild) Auk þess er notkun á DA-eitlagreiningu hugsanlega ekki hentug við prófun á efnum, sem hafa áhrif á ATP-innihald (t.d. efni sem virka sem ATP-latar), eða efnum sem hafa áhrif á nákvæmar mælingar á ATP innan frumu (t.d. tilvist ensíma sem brjóta niður ATP, tilvist ATP utan frumu í eitlinum). Fyrir utan þessar þekktu takmarkanir á að vera hægt að nota DA-eitlagreiningu til að prófa öll efni nema þau hafi eiginleika sem gætu haft áhrif á nákvæmni DA-eitlagreiningarinnar. Auk þess skal taka tillit til þess möguleika að jákvæðar niðurstöður séu óvissar þegar gildi örvunarstuðuls eru á milli 1,8 og 2,5 (sjá 31.–32. mgr.). Þetta er byggt á fullgildingargagnagrunni með 44 efnum með örvunarstuðli sem er $\geq 1,8$ (sjá 6. mgr.) þar sem DA-eitlagreining greindi rétt öll efnin 32 sem greinast sem næmar í eitlagreiningu en greindi rangt þrjú af 12 efnum sem greinast ekki sem næmar í eitlagreiningu og eru með örvunarstuðulsgildi milli 1,8 og 2,5 (þ.e. óvissar, jákvæðar niðurstöður) (10. heimild). Þar eð sama gagnasafn var notað til að ákvarða örvunarstuðulsgildi og til að reikna út forspáreiginleika prófunarinnar geta niðurstöðurnar þó verið ofmat á raunverulegum forspáreiginleikum.

MEGINREGLA PRÓFUNARÁÐFERÐARINNAR

6. DA-eitlagreining byggist á þeirri grundvallarreglu að næmar valdi fjölgun eitilfrumna í dreneitlunum við staðinn þar sem prófunarefnið var borið á. Þessi fjölgun er í réttu hlutfalli við skammtinn og mátt ofnæmisvaldsins, sem er borinn á, og er einföld leið til að fá meginlega mælingu á næmingunni. Fjölgunin er mæld með því að bera saman meðalfjölgun í hverjum prófunarhópi og meðalfjölgun í samanburðarhópnum sem fær burðarefni. Hlutfallið á milli meðalfjölgunar í hverjum meðhöndluðum hóp annars vegar og í samskeiða samanburðarhópnum sem fær burðarefni hins vegar, kallað örvunarstuðull, er ákvarðað og verður að vera $\geq 1,8$ til að ástæða sé til frekara mats á prófunarefninu sem hugsanlegum húðnæmi. Áðferðirnar, sem er lýst hér, byggjast á notkun mælinga á ATP-innihaldi með lífljómun (sem vitað er að hefur samsvörun við fjölda lifandi frumna) (17. heimild) til að gefa vísbendingu um fjölgun fruma í fjölgunarferli í dreneitlum í eyra (18. og 19. heimild). Í lífljómunaraðferðinni er notaður lúsíferasi, ensím sem hvatar ljósmýndun í ATP, og lúsíferín samkvæmt eftirfarandi efnahvarfi:



Styrkur ljóssins, sem berst út, hefur línulega fylgni við styrk ATP og er mældur með ljósmæli (e. *luminometer*). Lúsíferín-lúsíferasa-greiningin er nákvæm áðferð til að mælgreina ATP og er notuð á margvíslegan hátt (20. heimild).

LÝSING Á GREININGUNNI

Val á dýrategund

7. Mýs eru heppilegasta tegundin fyrir þessa prófun. Fullgildingarrannsóknir fyrir DA-eitlagreiningu voru eingöngu framkvæmdar með CBA/J-stofninum sem er því talinn heppilegasti stofninn (12. og 13. heimild). Prófunardýrin skulu vera ungar, fullorðnar kvenmýs sem eru eibærar og ekki með fangi. Í upphafi rannsóknarinnar skulu dýrin vera á bilinu 8–12 vikna og breytileiki í þyngd í lágmarki og ekki vikja meira en 20% frá meðalþyngd. Nota má aðra stofna og karldýr í staðinn ef aflað hefur verið nægilegra gagna til að staðfesta að ekki sé um að ræða verulegan mun á svörun eftir stofni og/eða kynjum í DA-eitlagreiningunni.

Aðbúnaður og fóðrun

8. Mýsnar skulu hafðar saman (21. heimild) nema það sé stutt fullnægjandi, vísindalegum rökum að hafa mýsnar hverja í sínu búri. Hitastigið í vistarverum tilraunadýranna skal vera 22 (± 3) °C. Þótt rakastig eigi að vera minnst 30 % og helst ekki yfir 70 %, nema við þrif á vistarverunum, er kjöraki 50–60%. Nota skal gervilýsingu og hafa til skiptis myrkur og birtu, 12 klukkustundir í senn. Nota má fóður sem er venjulega notað á rannsóknarstofum ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni.

Tilraunadýrin undirbúin

9. Dýrin eru valin af handahófi, merkt svo að hvert og eitt þeirra þekkist (þó ekki með eyrnamerkingu af neinu tagi) og höfð í búrum sínum í a.m.k. fimm daga áður en gjöf skammta hefst til að láta þau aðlagast umhverfisáðstæðum á rannsóknarstofunni. Áður en meðferð hefst eru öll dýrin rannsökuð til að ganga úr skugga um að þau hafi engar sýnilegar húðskemmdir.

Tilreiðsla skömmunarlausna

10. Íðefni í föstu formi skulu leyst upp eða blönduð í sviflausn með leysum eða burðarefnum og, ef við á, þynnt áður en þau eru borin á eyru músanna. Bera má fljótandi íðefni á óblönduð eða þynnt. Óleysanleg íðefni, t.d. þau sem að jafnaði eru í lækningatækjum, skulu dregin kröftuglega út í viðeigandi leysi til að í ljós komi allir útdraganlegir efnisþættir til prófunar áður en lausnin er borin á eyru músanna. Prófunarefnið skal tilreiða daglega nema gögn um stöðugleika sýni fram á að þau þoli geymslu.

Áreiðanleikakönnun

11. Jákvæð samburðariðefni eru notuð til að sýna fram á tilhlýðilegt nothæfi greiningarinnar með því að gefa svaranir með fullnægjandi og samburðarnákvæmri næmni fyrir næmandi prófunarefni með svörunarbíl sem er vel lýst. Mælt er með að hafa samskeiða, jákvæðan samburð þar eð hann sýnir fram á færni rannsóknarstofunnar til að framkvæma hverja greiningu á árangursríkan hátt og gefur færri á mati á samburðarnákvæmni og samburðarhæfi innan einstakra rannsóknarstofa sem og milli rannsóknarstofa. Sum stjórnvöld gera einnig kröfu um jákvæðan samburð í hverri rannsókn og því eru notendur hvattir til að hafa samráð við viðeigandi yfirvöld áður en þeir gera DA-eitlagreiningu. Til samræmis við það er hvatt til þess að samskeiða, jákvæður samburður sé notaður að staðaldrí (e. *routine use*) í því skyni að koma í veg fyrir að gera þurfi viðbótarprófanir á dýrum til að uppfylla þær kröfur sem notkun jákvæðs samburðar með reglubundnu millibili (e. *periodic*) kann að hafa í för með sér (sjá 12. mgr.). Jákvæði samburðarinnar á að veita jákvæða svörun í DA-eitlagreiningu við váhrifastyrk sem búist er við að kalli fram hækkun á örvunarstuðlinum sem nemur $\geq 1,8$ umfram neikvæða samburðarhópinn. Skammtastærð jákvæða samburðarinnar skal valin þannig að hún valdi ekki óhóflegri húðertingu eða altækum eiturrifum og örvunin sé samburðarnákvæm en ekki óhófleg (t.d. teldist örvunarstuðull sem er > 10 óhóflegur). Æskileg, jákvæð samburðariðefni eru 25% hexýlsinnaminaldehýð (CAS-nr. 101-86-0) og 25% evgenól (CAS-nr. 97-53-0) í asetón-ólífuolíublöndu (4:1 miðað við rúmmál). Við vissar aðstæður má nota önnur jákvæð samburðarefni sem uppfylla áðurgreindar viðmiðanir enda séu færð gild rök fyrir því.
12. Þó að mælt sé með því að hafa samskeiða, jákvæðan samburðarhóp með í greiningunni geta prófanir á jákvæða samburðinum með reglubundnu millibili (þ.e. með millibili sem er ≤ 6 mánuðir) verið fullnægjandi, við vissar aðstæður, fyrir rannsóknarstofur sem framkvæma reglulega DA-eitlagreiningu (þ.e. framkvæma DA-eitlagreiningu ekki sjaldnar en einu sinni í mánuði) og hafa komið sér upp rannsóknarsögulegum gagnagrunni um jákvæðan samburð sem sýnir fram á getu rannsóknarstofunnar til að fá fram samburðarnákvæmar og nákvæmar niðurstöður með jákvæðum samburði. Hægt er að sýna fram á fullnægjandi hæfni til DA-eitlagreiningar á árangursríkan hátt með því að fá fram jákvæðar niðurstöður með jákvæða samburðinum samfelt í a.m.k. 10 sjálfstæðum prófunum sem eru gerðar innan hæfilegs tíma (þ.e. innan eins árs).
13. Alltaf skal hafa samskeiða, jákvæðan samburðarhóp með þegar gerðar eru breytingar á tilhögun DA-eitlagreiningar: (t.d. breytingar á þjálfuðu starfsfólki, breytingar á efnun og/eða prófefnum í prófunaraðferðinni, breytingar á búnaði í prófunaraðferðinni eða breytingar á uppruna tilraunadýranna) og slíkar breytingar skulu skráðar í skýrslur rannsóknarstofunnar. Huga skal að áhrifum þessara breytinga á hæfni rannsóknarsögulega gagnagrunnsins, sem áður hafði verið komið á fót, þegar tekin er ákvörðun um það hvort nauðsynlegt sé að koma á fót nýjum, rannsóknarsögulegum gagnagrunni til að skrá samkvæmni í niðurstöðum úr jákvæðum samburði.
14. Rannsakendur skulu hafa það í huga að ákvörðunin um að framkvæma rannsókn með jákvæðum samburði með reglubundnu millibili í stað þess að hafa hann samskeiða hefur áhrif á það hvort neikvæðar rannsóknarniðurstöður, sem fást án samskeiða, jákvæðs samburðar á tímabilinu milli reglubundinna rannsókna á jákvæða samburðinum, teljist fullnægjandi og ásættanlegar. Ef falsneikvæðar niðurstöður fást t.d. í reglubundinni rannsókn á jákvæðum samburði mætti draga í efa neikvæðar niðurstöður úr prófunarefni sem fást á tímabilinu milli síðustu ásættanlegu, reglubundnu rannsóknarinnar á jákvæða samburðinum og óásættanlegu, reglubundnu rannsóknarinnar á jákvæða samburðinum. Áhrif þessara niðurstæðna skal gaumgæfa vandlega þegar tekin er ákvörðun um hvort nota eigi samskeiða, jákvæðan samburð eða hvort eingöngu eigi að framkvæma prófanir á jákvæðum samburði með reglubundnu millibili. Einnig þarf að taka til athugunar að nota færri dýr í samskeiða, jákvæða samburðarhópnum ef vísindaleg rök eru fyrir því og ef rannsóknarstofan sýnir fram á það, með rannsóknarsögulegum gögnum, sértækum fyrir rannsóknarstofuna, að hægt sé að nota færri mýs (22. heimild).

15. Þótt prófa eigi jákvæða samanburðarefnið í burðarefni sem vitað er að kallar stöðugt fram sömu svörun (t.d. í aseton-ólífuolíublöndu í rúmmálshlutfallinu 4:1) geta komið upp tiltekna aðstæður, í tengslum við reglusetningu, þar sem prófanir í óstöðluðu burðarefni (samsetningu sem skiptir máli klínískt eða efnafræðilega) eru einnig nauðsynlegar (23. heimild). Ef samskeiða, jákvæði samanburðurinn er prófaður í öðru burðarefni en prófunarefninu skal hafa sérstakan samanburðarhóp, sem fær burðarefni, fyrir samskeiða, jákvæða samanburðinn.
16. Í þeim tilvikum þegar verið er að meta efni í tilteknum iðefnaflokkum eða með tiltekið svörunarsvið geta viðmiðunarefni einnig verið gagnleg til að sýna fram á að prófunaraðferðin greini rétt húðnæmingarmátt efna af þessari gerð. Viðeigandi viðmiðunarefni skulu hafa eftirfarandi eiginleika:
 - líkindi í byggingu og virkni við efnaflokkinn sem verið er að prófa,
 - þekkt eðlisefnafræðilega eiginleika,
 - stuðningsgögn úr DA-eitlagreiningu,
 - stuðningsgögn úr öðrum dýralíkönum og/eða úr mönnum.

PRÓFUNARAÐFERÐ

Fjöldi dýra og skammtastærðir

17. Nota skal a.m.k. fjögur dýr fyrir hvern skammtahóp og a.m.k. þrjú mismunandi styrkleika af prófunarefninu, svo og samskeiða, neikvæðan samanburðarhóp, sem fær einungis meðhöndlun með burðarefni prófunarefnisins, og jákvæðan samanburð (samskeiða eða nýlegan, háð stefnu rannsóknarstofunnar að því er varðar 11.–15. mgr.) Íhuga skal prófun með mismunandi skammtastærðum af jákvæða samanburðinum, einkum ef jákvæði samanburðurinn er prófaður með reglubundnu millibili. Dýrin í samanburðarhópnum skulu fá nákvæmlega sömu meðferð og dýrin í meðferðarhópnum að öðru leyti en því að þau fyrrnefndu fá ekki meðhöndlun með prófunarefninu.
18. Val á skömmtum og burðarefni skal byggjast á ráðleggingunum sem eru gefnar í 2. og 24. heimild. Samfelldir skammtar eru venjulega valdir úr viðeigandi styrkleikaröð, s.s. 100%; 50%; 25%; 10%; 5%; 2,5%; 1%; 0,5% o.s.frv. Valið á styrkleikaröðinni, sem er notuð, skal stutt fullnægjandi, vísindalegum rökum. Taka skal til athugunar allar fyrirliggjandi eiturefnafræðilegar upplýsingar (t.d. um bráð eiturrif og húðertingu) og upplýsingar um byggingu og eðlisefnafræði prófunarefnisins sem miðað er við (og/eða efnis með skylda efnabyggingu), ef þessar upplýsingar eru tiltækar, þegar valdir eru þrjú samfelldir styrkleikar svo að mestu váhrifin verði við mesta styrkinn en komist verði hjá altækum eiturrifum og/eða óhóflegri, staðbundinni húðertingu (24. og 25. heimild). Skorti þessar upplýsingar kann að vera nauðsynlegt að forskima í upphafi (sjá 21.–24. mgr.).
19. Burðarefni má ekki trufla eða bjaga niðurstöðuna úr prófuninni og skal valið með það að markmiði að hámarka leysnina til að fá eins háan styrk og unnt er og jafnframt lausn eða sviflausn sem hentar vel til að gefa efnið. Burðarefni, sem mælt er með, eru aseton-ólífuolíublanda (í rúmmálshlutfallinu 4:1), N,N-dímetýlfórmasíð, metýletýlketón, própýlenglýkól og dímetýlsúlfoxíð (6. heimild) en nota má önnur burðarefni ef færð eru nægileg, vísindaleg rök fyrir því. Í sumum tilvikum getur verið nauðsynlegt að nota leysi, sem hentar út frá klínískri skírskotun, eða efnablönduna, sem prófunarefnið er selt í á markaði, sem viðbótarsamanburð. Sérstaklega þarf að sjá til þess að vatnssækin efni, sem halda húðinni votri og renna ekki strax af, séu höfð með burðarefninu með því að hafa viðeigandi uppleysandi efni með (t.d. 1% Pluronic® L92). Þess vegna ber að forðast að nota burðarefni sem eru eingöngu vatnskennd.
20. Með greiningu eitla úr einstökum músum er hægt að meta breytileika milli dýra og gera tölfræðilegan samanburð á muninum á mælingum í hópnum sem fær prófunarefni og samanburðarhópnum sem fær burðarefni (sjá 33. mgr.) Auk þess er einungis gerlegt að meta möguleikann á að fækka músum í jákvæða samanburðarhópnum ef safnað er gögnum um einstök dýr (22. heimild). Einnig krefjast sum stjórnvöld þess að gögn um einstök dýr séu tekin saman. Reglubundin söfnun gagna um einstök dýr hefur kosti með tilliti til velferðar dýra þar eð hún kemur í veg fyrir að endurtaka þurfi prófanir ef prófunarniðurstöður, sem voru upphaflega teknar saman á tiltekinn hátt (t.d. úr safngögnum um dýr), verða síðar yfirfarnar hjá stjórnvöldum sem gera aðrar kröfur (t.d. um gögn um einstök dýr).

Forskimun

21. Ef upplýsingar til ákvörðunar á stærsta skammti sem skal prófaður eru ekki fyrir hendi (sjá 18. mgr.) skal framkvæma forskimun til þess að skilgreina viðeigandi prófunarskammtastærð fyrir DA-eitlagreininguna. Tilgangurinn með forskimun er að veita leiðbeiningar um val á hámarksskammtinum, sem nota skal í meginhluta DA-eitlagreiningarinnar, ef upplýsingar um styrkinn, sem veldur altækum eiturrifum (sjá 24. mgr.) og/eða óhóflegri, staðbundinni húðertingu (sjá 23. mgr.), eru ekki tiltækar. Hámarksskammturinn, sem er prófaður, skal vera prófunarefnið, óþynnt ef það er fljótandi eða í mesta mögulega styrk ef það er fast efni eða sviflausn.

22. Forskimun er framkvæmd við eins aðstæður og í meginhluta DA-eitlagreiningarinnar, burtséð frá því að mati á frumufjölgun í eitlum er sleppt og hægt er að nota færri dýr í hverjum skammtahóp. Lagt er til að notuð séu eitt til tvö dýr í hverjum skammtahóp. Allar mýs eru skoðaðar daglega til að kanna hvort sjá megi einhver klínísk einkenni um altæk eiturrhrif eða staðbundna ertingu á áburðarstað. Líkamsþyngd er skráð fyrir prófunina og áður en prófun lýkur (8. dagur). Hörundsroði er skoðaður á báðum eyrum allra músa og gefin stig samkvæmt töflu 1 (25. heimild). Þykkt eyrnanna er mæld með þykktarmæli (t.d. stafrænum mikrósmæli eða Peacock Dial-þykktarmæli) á 1. degi (áður en prófunarefni er borið á), á 3. degi (u.þ.b. 48 tímum eftir að prófunarefni er fyrst borið á), á 7. degi (24 tímum fyrir lokin) og á 8. degi. Á 8. degi er auk þess unnt að ákvarða þykkt eyrna með vigtnun sýna sem eru tekin úr eyrunum með sýnistöng eftir að dýrin hafa verið aflífuð á mannúðlegan hátt. Hörundsroðastig, sem eru ≥ 3 , og/eða eyrnaþykkt, sem er $\geq 25\%$, á einhverjum mælingadaganna benda til óhóflegrar, staðbundinnar ertingar (26. og 27. heimild). Stærsti skammturinn, sem er valinn fyrir meginhluta DA-eitlagreiningarinnar, er næststærsti skammturinn í styrkröð forskimunarinnar sem veldur ekki altækum eiturrhrifum og/eða óhóflegri, staðbundinni húðertingu (sjá 18. mgr.).

Tafla 1

Hörundsroðastig

Athugun	Stig
Enginn hörundsroði	0
Örlítill hörundsroði (vart sjáanlegur)	1
Greinilegur hörundsroði	2
Hörundsroði í meðallagi eða mikill	3
Mikill hörundsroði (purpurroði) eða brunaskorpumyndun sem hindrar stigagjöf fyrir hörundsroða	4

23. Auk 25% þykkunar eyra (26. og 27. heimild) hefur tölfraðilega marktæk aukning í þykkun eyra hjá meðhöndluðum músum, umfram þykkun hjá músum í samanburði, einnig verið notuð til að greina ertandi efni í eitlagreiningunni (28.–34. heimild). En þó að tölfraðilega marktæk aukning geti orðið ef eyrnaþykkt er minni en 25% hefur hún þó ekki verið tengd sérstaklega við óhóflega ertingu (30.–34. heimild).
24. Eftirfarandi klínískar athuganir geta gefið til kynna altæk eiturrhrif (35. heimild), ef þær eru notaðar sem hluti af samþættu mati, og þannig verið visbending um þann hámarksskammt sem nota skal í meginhluta DA-eitlagreiningarinnar: breytingar á starfsemi taugakerfisins (t.d. hárris, slingur, skjálfti og krampi), hegðunarbreytingar (t.d. áráshneigð, breytingar á snyrtingu, greinilegar breytingar á virkni), breytingar á öndunarmynstri (þ.e. breytingar á tíðni andardráttar og krafti öndunar, s.s. andnað, andköf og brakhljóð) og breytingar á föður- og vatnsneyslu. Matið skal auk þess taka tillit til merkja um sinnuleysi og/eða skort á viðbrögðum og til allra klínískra einkenna um meira en vægan eða skammlífán sársauka og þjáningar eða $> 5\%$ minnkun á líkamsþyngd frá 1. degi til 8. dags, auk dánarhlutfalls. Dauðvona dýr og dýr, sem sýna merki um mikinn sársauka og þjáningu, skal aflífa á mannúðlegan hátt (36. heimild).

Tilraunaáætlun meginrannsóknar

25. Tilraunaáætlunin fyrir greininguna er sem hér segir:

- 1. dagur: Hvert dýr skal auðkennt og vegið og þyngd þess og allar klínískar athuganir skráðar. Borin er vatnslausn með 1% natríumlárylsúlfati aftan á bæði eyrum með burstu, sem hefur verið dýft í natríumlárylsúlfat-lausnina, þannig að fjórar til fimm pensilstrokur þeki alla bakhlið eyrans. Einni klukkustund eftir natríumlárylsúlfat-meðhöndlunina eru bornir 25 μ l af hæfilega þynntu prófunarefninu, burðarefninu eingöngu eða jákvæða samanburðinum (samskeiða eða nýlegum, háð stefnu rannsóknarstofunnar að því er varðar 11.–15. mgr.) aftan á bæði eyrun.
- 2., 3. og 7. dagur: Formeðhöndlað er aftur með vatnslausninni með 1% natríumlárylsúlfati og borið aftur á dýrin eins og á 1. degi.
- 4., 5. og 6. dagur: Engin meðhöndlun.
- 8. dagur: Þyngd hvers dýrs og allar klínískar athuganir eru skráðar. Dýrin eru aflífuð á mannúðlegan hátt u.þ.b. 24–30 klst. eftir upphaf áburðar á 7. degi. Dreineitlarnir eru skornir úr hvoru eyra músanna og settir, sér fyrir hvert dýr, í fosfatjafnaða saltlausn (PBS). Nákvæmar upplýsingar og skýringarmyndir af greiningu og krufningu eitla er að finna í 22. heimild. Til að vakta enn frekar staðbundna húðsvörun í meginrannsókninni er hægt að hafa viðbótarmælipætti með í rannsóknaráætluninni, s.s. stig fyrir hörundsroða á eyra eða mælingar á þykkt eyra (fengnar annaðhvort með því að nota þykktarmæli eða með vigtnun sýna, teknum með sýnistöng úr eyrum við krufningu).

Tilreiðsla frumusviflausna

26. Fyrir hverja mús er tilreidd sviflausn með stökum eitilfrumum, skornum úr báðum eyrum, með því að setja eitla milli tveggja sýnisglerja og þrýsta létt á þau til að krenja eitlana. Þegar staðfest hefur verið að vefurinn hefur breiðst út í þunnt lag eru sýnisglerin tekin í sundur. Búin er til sviflausn með vefnum af báðum glerjunum í fosfatjafnaðri saltlausn með því að halla báðum sýnisglerjunum yfir ræktunarskál og skola þau með fosfatjafnaðri saltlausn um leið og vefurinn er skafinn af með frumusköfu. Eitlarnir í dýrunum í neikvæða samanburðinum eru smáir og því er mikilvægt að fara varlega til að komast hjá gervíáhrifum á örvunarstuðulsgildin. Nota skal 1 ml að heildarrúmmáli af fosfatjöfnuðu saltlausninni til að skola bæði glerin. Eitilfrumnasviflausnin í ræktunarskálinni er jafnblönduð litillega með frumusköfunni. Síðan er 20 µl deiliskammtur af eitilfrumnasviflausninni tekinn í örpípettu, og þess gætt að ekki fylgi með sjáanleg himna, og honum síðan blandað í 1,98 ml af fosfatjafnaðri saltlausn svo úr verði 2 ml sýni. Annað 2 ml sýni er þá tilreitt með sömu aðferð og þannig gerð tvö sýni fyrir hvert dýr.

Ákvörðun á frumufjölgun (mæling á ATP-innihaldi eitilfrumna)

27. Aukning á ATP-innihaldi í eitlum er mæld með lúsiferín/lúsiferasa-aðferðinni með notkun ATP-mælissetts sem mælir lífljómun í hlutfallslegum ljómunareiningum (e. *Relative Luminescence Units (RLU)*). Greiningartíminn, frá því dýrið er aflífað og þar til ATP-innihaldið er mælt fyrir hvert dýr, skal hafður jafn, innan við u.þ.b. 30 mínútur, vegna þess að ATP-innihald er talið minnka smám saman eftir aflifun dýrs (12. heimild). Því skal ljúka ferlinu, frá því að dreineitlarnir eru skornir burt og fram að mælingunni á ATP, á innan við 20 mínútum samkvæmt fyrirframákveðinni tímaáætlun sem er eins fyrir öll dýrin. Mæla skal ATP-ljómun í hverju 2 ml sýni þannig að samtals séu teknar tvær ATP-mælingar fyrir hvert dýr. Síðan er meðalljómun ATP ákvörðuð og notuð við útreikningana (sjá 30. mgr.).

ATHUGANIR**Klínískar athuganir**

28. Hver mús skal skoðuð gaumgæfilega a.m.k. einu sinni á dag til að kanna hvort sjá megi einhver klínísk einkenni hjá dýrunum, annaðhvort um staðbundna ertingu á áburðarstað eða altæk eiturrhif. Skrá skal allar athuganir kerfisbundið í sérstaka skrá fyrir hvert dýr. Vöktunaráætlanir skulu fela í sér viðmiðanir til að greina þegar í stað þær mýs sem sýna altæk eiturrhif, óhóflega, staðbundna húðertingu eða húðætingu og skulu aflífaðar (36. heimild).

Líkamsþyngd

29. Eins og tilgreint er í 25. mgr. skal vigta hvert dýr við upphaf prófunar og þegar dýrið er aflífað á mannúðlegan hátt samkvæmt áætlun.

ÚTREIKNINGUR Á NIÐURSTÖÐUM

30. Niðurstöður fyrir hvern meðferðarhóp eru gefnar upp sem meðalörvunarstuðull. Örvunarstuðullinn er fenginn með að deila í meðaltal hlutfallslegra ljómunareininga/mús innan hvers hóps sem fær prófunarefnið og í meðaltalið innan jákvæða samanburðarhópsins með meðaltali hlutfallslegra ljómunareininga/mús í samanburðarhópnum sem fær leysi eða burðarefni. Meðalörvunarstuðullinn fyrir samanburðarhópin, sem fær burðarefni, er þá 1.
31. Í ákvörðunarferlinu er litið svo á að niðurstaða sé jákvæð ef örvunarstuðullinn er $\geq 1,8$ (10. heimild). Þó má einnig nota styrk tengslanna milli skammts og svörunar, tölfræðilega marktækni og samkvæmni í svörnum, sem fást með leysi eða burðarefni og jákvæða samanburðinum, við ákvörðun á því hvort líta skuli á óvissar niðurstöður (þ.e. örvunarstuðulsgildi milli 1,8 og 2,5) sem jákvæðar (2., 3. og 37. heimild).
32. Ef jákvæð svörun er óviss, með örvunarstuðul milli 1,8 og 2,5, geta notendur íhugað að nota viðbótarupplýsingar, s.s. tengslin milli skammts og svörunar, vísbendingar um altæk eiturrhif eða óhóflega ertingu og, eftir því sem við á, tölfræðilega marktækni ásamt örvunarstuðulsgildum, til að staðfesta að slíkar niðurstöður séu jákvæðar (10. heimild). Einnig skal huga að ýmsum eiginleikum prófunarefnisins, þ.m.t. hvort það er skylt þekktum húðnæmum að byggingu og hvort það veldur óhóflegri húðertingu hjá músum og hvert er eðli tengslanna sem fram koma milli skammts og svörunar. Fjallað er ítarlega um þetta og önnur atriði annars staðar (4. heimild).
33. Ef gögn eru tekin saman fyrir einstakar mýs gefur það færi á tölfræðilegri greiningu á tilvist og umfangi tengslanna milli skammts og svörunar í gögnunum. Tölfræðilegt mat getur falið í sér mat á tengslunum milli skammts og svörunar sem og samanburð á prófunarhópum sem er aðlagður á viðeigandi hátt (t.d. meðhöndlaður hópur, paraður á móti samskeiða samanburðarhópi sem fær leysi eða burðarefni). Tölfræðileg greining getur t.d. falið í sér línulegt aðhvarf eða Williams-prófun, til að meta leitni í skammtasvörun, og Dunnett-prófun fyrir samanburð para. Þegar velja skal viðeigandi aðferð fyrir tölfræðilega greiningu þarf rannsakandi að vera meðvitaður um hugsanlegan ójöfnuð í dreifni og önnur skyld vandamál sem kunna að útheimta umbreytingu gagna eða tölfræðilega greiningu án breytna. Hvað sem öðru líður kann rannsakandinn að þurfa að reikna út örvunarstuðla og gera tölfræðilegar greiningar með og án tiltekinna gagnapunkta (sem eru stundum kallaðir einfasar).

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Gögn

34. Gögn skulu tekin saman í töflu sem sýnir gildi hlutfallslegra ljómunareininga fyrir hvert dýr, hópmeðaltal hlutfallslegra ljómunareininga/dýr, skekkjuliði þess (t.d. staðalfrávik, staðalskekkju meðaltalsins), og samanburð á meðalörvunarstuðli fyrir hvern skammtahóp og samskeiða samanburðarhópin sem fær leysi eða burðarefni.

Prófunarskýrsla

35. Prófunarskýrslan skal innihalda eftirfarandi upplýsingar:

Prófunar- og samanburðariðefni:

- auðkennisgögn (t.d. CAS- og EB-númer, liggja þau fyrir, uppruni, hreinleiki, þekkt óhreinindi, lotunúmer),
- eðlisástand og eðlisefnafræðilegir eiginleikar (t.d. rokgirni, stöðugleiki og leysni),
- ef um blöndu er að ræða: samsetning og innbyrðis hlutfall efnisþátta.

Leysir og burðarefni:

- auðkennisgögn (hreinleiki, styrkur, ef við á, og rúmmál efnis sem er notað),
- rök fyrir vali á burðarefni.

Tilraunadýr:

- uppruni músa af stofni CBA,
- örverufræðilegt ástand dýranna, ef það er þekkt,
- fjöldi og aldur dýranna,
- uppruni dýranna, aðbúnaður, fóður o.s.frv.

Prófunaraðstæður:

- uppruni, lotunúmer og gæðatrygging framleiðanda/gögn um gæðastýringu fyrir ATP-mælissettið,
- upplýsingar um tilreiðslu prófunarefnis og hvernig það er borið á,
- rök fyrir vali á skömmtum (þ.m.t. niðurstöður úr forskimun ef hún er gerð),
- styrkur burðarefnis og prófunarefnis og heildarmagn prófunarefnis sem er borið á,
- upplýsingar um gæði fóðurs og vatns (þ.m.t. tegund og uppruni fóðurs og uppruni vatns),
- upplýsingar um meðferðar- og sýnatökuáætlanir,
- aðferðir við mælingar á eiturrhifum,
- viðmiðanir til að meta hvort niðurstöður rannsókna séu jákvæðar eða neikvæðar,
- upplýsingar um öll frávik frá aðferðarlýsingum og skýring á því hvaða áhrif frávikin hefur á tilhögun og niðurstöður rannsóknarinnar.

Áreiðanleikakönnun:

- samantekt á niðurstöðum síðustu áreiðanleikakönnunar, þ.m.t. upplýsingar um prófunarefni, styrk og burðarefni,

- samskiða og/eða rannsóknarsöguleg gögn prófunarstofunnar varðandi jákvæðan samanburð og samskiða, neikvæðan samanburð (leysir eða burðarefni),
- ef samskiða, jákvæður samanburður var ekki hafður með: gögn og rannsóknarstofuskýrsla um nýjasta reglubundna, jákvæða samanburðinn og skýrsla með upplýsingum um rannsóknarsöguleg gögn um jákvæðan samanburð rannsóknarstofunnar ásamt rökum fyrir því að ekki var framkvæmdur samskiða, jákvæður samanburður.

Niðurstöður:

- þyngd hverrar músar við upphaf skömmunar og við aflifun samkvæmt áætlun, sem og meðaltal og skekkjuliðir (t.d. staðalfrávik, staðalskekkja meðaltals) fyrir hvern meðferðarhóp,
- tíminn þegar eiturrifa varð vart og hvernig þau þróast, þ.m.t. húðerting, ef einhver er, á áburðarstað, fyrir hvert dýr,
- tímasetning aflifunar dýrsins og tímasetning mælinga á ATP fyrir hvert dýr;
- tafla yfir gildi hlutfallslegra ljómunareininga fyrir hvert dýr og örvunarstuðulsgildi fyrir hvern meðferðarhóp,
- meðaltal og skekkjuliðir (t.d. staðalfrávik, staðalskekkja meðaltals) hlutfallslegra ljómunareininga/mús fyrir hvern meðferðarhóp og niðurstöður greiningar á einförum fyrir hvern meðferðarhóp,
- útreiknaður örvunarstuðull og viðeigandi mælingar á breytileika sem taka tillit til breytileika milli dýra, bæði í prófunarefnishópum og samanburðarhópum,
- tengsl milli skammts og svörunar,
- tölfræðileg greining ef við á.

Umræða um niðurstöður.

- Stuttar athugasemdir um niðurstöður, greining á skammtasvörun og tölfræðileg greining, eftir því sem við á, með ályktun um það hvort prófunarefnið skuli teljast húðnæmir.

HEIMILDIR

- 1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Aðgengilegt á: [<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. Aðgengilegt á: [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. Aðgengilegt á: [<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. Aðgengilegt á: [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. Aðgengilegt á: [<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. Aðgengilegt á: [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. Aðgengilegt á: [<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. Aðgengilegt á: [<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 Pfisteria 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. Aðgengilegt á: [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. Aðgengilegt á: [<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. Aðgengilegt á: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

1. viðbætur

SKILGREININGAR

Nákvæmni: Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktu viðmiðunargildi niðurstaða úr prófun er. Nákvæmni er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferða og einn þáttur gildis (e. *relevance*). Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli réttra niðurstaðna úr prófunaraðferð (38. heimild).

Viðmiðunarefni Efni sem er næmandi eða ekki næmandi og er notað sem viðmiðunarstaðall fyrir prófunarefni. Viðmiðunarefni skal hafa eftirfarandi eiginleika, i) einsleit og áreiðanlegan uppruna, ii) líkindi í byggingu og virkni við efnaflokkinn sem er verið að prófa, iii) þekkt eðlisefnafræðilega eiginleika, iv) stuðningsgögn um þekkt áhrif og v) þekktan mátt á sviði æskilegrar svörunar.

Falsneikvætt efni: Efni sem er ranglega greint sem neikvætt eða óvirkt með tiltekinni prófunaraðferð þegar það er í raun jákvætt eða virkt.

Falsjálkvætt efni: Efni sem er ranglega greint sem jákvætt eða virkt með tiltekinni prófunaraðferð þegar það er í raun neikvætt eða óvirkt.

Hætta: Möguleikinn á skaðlegum áhrifum á heilbrigði eða skaðlegum, vistfræðilegum áhrifum. Skaðlegu áhrifin koma aðeins fram ef umfang váhrifa er nógu mikið.

Fjölsetra samanburðarnákvæmni: Mæling á því að hvaða marki mismunandi rannsóknarstofur með réttindi og hæfi, sem nota sömu aðferðarlýsingu og gera prófanir á sömu prófunarefnum, komast að niðurstöðum sem eru eigindlega og megindlega samsvarandi. Fjölsetra samanburðarnákvæmni, einnig kölluð samanburðarnákvæmni milli rannsóknarstofa, er ákvörðuð meðan á forfullgildingar- og fullgildingarferlinu stendur og gefur til kynna að hvaða marki tekst að flytja prófun með fullnægjandi hætti á milli rannsóknarstofa (38. heimild).

Einseturssamanburðarnákvæmni: Ákvörðun á því að hvaða marki fólki með réttindi og hæfi og á sömu rannsóknarstofu tekst með fullnægjandi hætti að endurtaka niðurstöður með notkun tilgreindrar aðferðarlýsingar á mismunandi tímum. Einnig kölluð samanburðarnákvæmni innan rannsóknarstofu (38. heimild).

Einfari: Einfari er mæling sem er greinilega öðruvísi en önnur gildi í slembisýni úr hópi.

Gæðatrygging: Stjórnunarferli sem felur í sér að aðilar, sem eru óháðir þeim sem framkvæma prófunina, meta fylgni við prófunarstaðla rannsóknarstofunnar, kröfur og tilhögun skráningar og áreiðanleika gagnaflutninga.

Áreiðanleiki: Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma prófunaraðferð með samanburðarnákvæmni hjá hverri rannsóknarstofu og hjá mismunandi rannsóknarstofum í tiltekinn tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Áreiðanleiki er metinn með því að reikna út einseturssamanburðarnákvæmni og fjölsetra samanburðarnákvæmni (38. heimild).

Húðnæming: Ónæmisfræðilegt ferli sem er afleiðing þess að næmur einstaklingur verður fyrir staðbundnum váhrifum frá íðefni sem er ofnæmisvaldur og framkallar ónæmissvörin í húð sem getur leitt til þróunar næmingar við snertingu.

Örvunarstuðull: Gildi til að meta húðnæmingarmátt prófunarefnis sem er reiknað út sem hlutfall á milli fjölgunar í meðhöndluðum hópum og samskeiða samanburðarhópi sem fær eingöngu burðarefni.

Prófunarefni (einnig kallað prófunariðefni): Sérhvert efni og blanda sem eru prófuð með þessari prófunaraðferð.

B.51. HÚÐNÆMING: BRDU-ELISA-EITLAGREINING

INNGANGUR

- Viðmiðunarreglur Efnahags- og framfarastofnunarinnar um prófun íðefna og prófunaraðferðir ESB eru endurskoðaðar reglulega með hliðsjón af framþróun í vísindum, þörfum á nýrri löggjöf og sjónarmiðum er varða velferð dýra. Fyrsta prófunaraðferðin (kafla B.42) til að ákvarða húðnæmingu hjá músum, eitlagreining (e. *Local Lymph Node Assay* (LLNA)) (OECD-viðmiðunarregla 429 um prófanir) hefur verið endurskoðuð (1. heimild og kafla B.42 í þessum viðauka). Upplýsingar um fullgildingu eitlagreiningar og yfirlit yfir það starf sem tengist henni hafa verið birtar (2.–9. heimild). Í eitlagreiningunni er notuð geislavirk samsæta af týmidíni eða jöði til að mæla fjölgun eitilfrumna og því eru takmörkuð not af greiningunni þegar öflun á geislavirkni, notkun hennar eða förgun er erfið. BrdU-Elisa-eitlagreining (e. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) er ógeislavirk breyting á eitlagreiningu þar sem ekki er notuð geislavirkni heldur 5-bróm-2-deoxýúridín (hér á eftir „BrdU“) (skráningarnúmer Upplýsingaþjónustu um íðefni, CAS-nr. 59-14-3), sem er ekki geislamerkt, í prófunarkerfi byggðu á ELISA-prófun til að mæla fjölgun eitilfrumna. Alþjóðlegur, óháður vísindaritrynihópur hefur fullgilt og yfirfarið BrdU-ELISA-eitlagreininguna og mælir með henni sem gagnlegri til greiningar, með tilteknum takmörkunum, á húðnæmandi íðefnum og íðefnum sem eru ekki húðnæmandi (10.–12. heimild). Þessi prófunaraðferð er gerð til að meta húðnæmingarmátt íðefna (efna og blandna) hjá dýrum. Samkvæmt kafla B.6 í þessum viðauka og OECD-viðmiðunarreglu 406 um prófanir eru notaðar prófanir á naggrísnum, einkum hámarksprófun á naggrísnum og Buehlers-prófun (13. heimild). Eitlagreiningin (kafla B.42 í þessum viðauka, OECD-viðmiðunarregla 429 um prófanir) og ógeislavirku, breyttu aðferðirnar tvær, BrdU-ELISA-eitlagreining (kafla B.51 í þessum viðauka, OECD-viðmiðunarregla 442 B um prófanir) og DA-eitlagreining (kafla B.50 í þessum viðauka, OECD-viðmiðunarregla 442 A um prófanir) eru allar fremri prófununum á naggrísnum í kafla B.6 og OECD-viðmiðunarreglu 406 um prófanir (13. heimild) að því leyti að með þeim er dregið úr notkun á dýrum og hún milduð.

2. Líkt og eitlagreining er BrdU-ELISA-eitlagreining notuð til að rannsaka örvunarfasa húðnæmingar og veita megindlegar upplýsingar sem henta til að meta skammtasvör. Auk þess kemur getan til að greina húðnæma, án þess að þurfa að nota geislamerkingu fyrir DNA, í veg fyrir hættu á váhrifum frá geislavirki í starfi og vandamál vegna förgunar úrgangs. Það gæti gert kleift að nota í auknum mæli mýs til að greina húðnæma en það myndi draga enn frekar úr notkun naggrísa í prófunum á húðnæmingarmætti (þ.e. kafli B.6, OECD-viðmiðunarregla 406 um prófanir) (13. heimild).

SKILGREININGAR

3. Skilgreiningar, sem eru notaðar, eru gefnar upp í 1. viðbæti.

ATRÍÐI, SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI, OG TAKMARKANIR

4. BrdU-ELISA-eitlagreining er breyting á eitlagreiningu og ætluð til að greina, með tilteknum takmörkunum, íðefni sem kunna að vera næmandi. Þetta þýðir ekki endilega að alltaf skuli nota BrdU-ELISA-eitlagreiningu í stað eitlagreiningar eða prófunar á naggrísum (B.6, OECD-viðmiðunarregla 406 um prófanir) (13. heimild) heldur að greiningin sé jafngild og að hana megi nota sem staðgönguaðferð í tilvikum þar sem jákvæðar eða neikvæðar niðurstöður þurfa að jafnaði ekki frekari staðfestingar við (10. og 11. heimild). Prófunarstofan skal skoða allar fáanlegar upplýsingar um prófunarefnið áður en rannsókn hefst. Meðal slíkra upplýsinga eru auðkenni og efnafraðileg bygging prófunarefnisins, eðlisefnafraðilegir eiginleikar þess, niðurstöður úr öllum öðrum eiturhrifaprófunum á prófunarefninu í glasi og í lífi og eiturefnafraðileg gögn um efni með skylda byggingu. Þessar upplýsingar skulu skoðaðar í því skyni að ákvarða hvort BrdU-ELISA-eitlagreining sé viðeigandi fyrir prófunarefnið (með hliðsjón af því að ekki er unnt að nota BrdU-ELISA-eitlagreiningu fyrir tiltekna tegundir íðefna (sjá 5. mgr.)) og til að auðvelda val á skömmtum.
5. BrdU-ELISA-eitlagreining er aðferð til greiningar í lífi og þar af leiðandi útilokar hún ekki að dýr séu notuð við mat á næmingu fyrir snertiofnæmi. Hún gefur þó færi á að fækka dýrunum, sem nota þarf í þessum tilgangi, í samamburði við naggrísaprófanir (B.6, OECD-viðmiðunarregla 406 um prófanir) (13. heimild). Auk þess býður BrdU-ELISA-eitlagreining upp á verulega framför í meðferð dýra við prófanir á næmingu fyrir snertiofnæmi því að við BrdU-ELISA-eitlagreiningu er ekki þörf á að kalla fram áreitissvöðva ofurnæmissvörin í húð, ólíkt B.6 og OECD-viðmiðunarreglu 406 fyrir prófanir. Ekki þarf heldur að nota glæðiefni við BrdU-ELISA-eitlagreiningu eins og gera þarf við hámröskunaprófun á naggrísum (kafli B.6 í þessum viðauka, 13. heimild). BrdU-ELISA-eitlagreining minnkar því þær þjáningar sem dýrin þurfa að þola. Þrátt fyrir kosti BrdU-ELISA-eitlagreiningar umfram B.6 og OECD-viðmiðunarreglu 406 um prófanir (13. heimild) hefur hún vissar takmarkanir sem geta gert það nauðsynlegt að nota B.6 eða OECD-viðmiðunarreglu 406 um prófanir (t.d. vegna prófana á tilteknum málumum, falsjákvæðra niðurstaðna vegna tiltekinna húðertingarefna, (s.s. sumra yfirborðsvirkra efna) (6. og 1. heimild og kafli B.42 í þessum viðauka) og leysni prófunarefnisins). Auk þess getur verið nauðsynlegt að nota prófanir á naggrísum vegna íðefnaflokka eða efna sem innihalda virka hópa sem sýnt hefur verið fram á að geti verið truflandi þættir (15. heimild) (þ.e. B.6, OECD-viðmiðunarreglu 406 um prófanir) (13. heimild). Mælt er með að þær takmarkanir eitlagreiningarinnar, sem komið hafa í ljós (1. heimild og kafli B.42 í þessum viðauka), séu einnig látnar gilda um BrdU-ELISA-eitlagreiningu (10. heimild). Fyrir utan þessar þekktu takmarkanir á að vera hægt að nota BrdU-ELISA-eitlagreiningu til að prófa öll íðefni nema þau hafi eiginleika sem gætu haft áhrif á nákvæmni BrdU-ELISA-eitlagreiningarinnar. Auk þess skal taka tillit til þess möguleika að jákvæðar niðurstöður séu óvissar þegar gildi örvunarstuðuls eru á milli 1,6 og 1,9 (sjá 31.–32. mgr.). Þetta er byggt á fullgildingargagngrunni með 43 efnum með örvunarstuðli sem er $\geq 1,6$ (sjá 6. mgr.) þar sem BrdU-ELISA-eitlagreining greindi rétt öll efnin 32 sem greinast sem næmar í eitlagreiningu en greindi rangt tvö af 11 efnum sem greinast ekki sem næmar í eitlagreiningu og eru með örvunarstuðulsgildi milli 1,6 og 1,9 (þ.e. óvissar, jákvæðar niðurstöður) (10. heimild). Þar eð sama gagnasafn var notað til að ákvarða örvunarstuðulsgildi og til að reikna út forspáreginleika prófunarinnar geta niðurstöðurnar þó verið ofmat á raunverulegum forspáreginleikum.

MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

6. BrdU-ELISA-eitlagreining byggist á þeirri grundvallarreglu að næmar valdi fjölgun eartilfrumna í dreinitlum við staðinn þar sem prófunarefnið var borit á. Þessi fjölgun er í réttu hlutfalli við skammtinn og mátt ofnæmisvaldsins sem er borinn á og er einföld leið til að fá megindlega mælingu á næmingunni. Fjölgunin er mæld með því að bera saman meðalfjölgun í hverjum prófunarhópi og meðalfjölgun í samamburðarhópnum sem fær burðarefni. Hlutfallið á milli meðalfjölgunar í hverjum meðhöndluðum hóp annars vegar og samskeiða samamburðarhópsins sem fær burðarefni hins vegar, kallað örvunarstuðull, er ákvarðað og verður að vera $\geq 1,6$ til að ástæða sé til fyrir frekara mat á prófunarefninu sem hugsanlegs húðnæmis. Aðferðirnar, sem er lýst hér, byggjast á mælingu á BrdU innihaldi til að fá vísbendingu um fjölgun fruma í fjölgunarferli í dreinitlum í eyra. BrdU er hliðstætt efni við týmidín og er tekið upp á sama hátt í DNA frumna í fjölgunarferli. Upptakan á BrdU er mæld með ELISA-prófun með notkun mótefnis sem er sértækt fyrir BrdU og er einnig merkt með peroxíði. Þegar ensímhvarfefni er bætt við hvarfast peroxíðið við ensímhvarfefnið og framleiðir litaða afurð sem er magngreind við tiltekna gleypni með því að nota örbakkalesara.

LÝSING Á GREININGUNNI

Val á dýrategund

7. Mýs eru heppilegasta tegundin fyrir þessa prófun. Fullgildingarrannsóknir fyrir BrdU-ELISA-eitlagreiningu voru eingöngu framkvæmdar með CBA/JN-stofninum sem er því talinn heppilegasti stofninn (10. og 12. heimild). Prófunardýrin skulu vera ungar, fullorðnar kvenmýs sem eru eibærar og ekki með fangi. Í upphafi rannsóknarinnar skulu dýrin vera á bilinu 8–12 vikna og breytileiki í þyngd í lágmarki og ekki víkja meira en 20% frá meðalþyngd. Nota má aðra stofna og karldýr í staðinn ef aflað hefur verið nægilegra gagna til að staðfesta að ekki sé um að ræða verulegan mun á svörum eftir stofni og/eda kynjum í BrdU-ELISA-eitlagreiningunni.

Aðbúnaður og fóðrun

8. Mýsnar skulu hafðar saman (16. heimild) nema það sé stutt fullnægjandi, vísindalegum rökum að hafa mýsnar hverja í sínu búri. Hitastigið í vistarverum tilraunadýranna skal vera 22 (± 3) °C. Þótt rakastig eigi að vera minnst 30 % og helst ekki yfir 70 %, nema við þrif á vistarverunum, er kjöraki 50–60%. Nota skal gervilyngu og hafa til skiptis myrkur og birtu, 12 klukkustundir í senn. Nota má fóður sem er venjulega notað á rannsóknarstofum ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni.

Tilraunadýrin undirbúin

9. Dýrin eru valin af handahófi, merkt svo að hvert og eitt þeirra þekkist (þó ekki með eyramerkingu af neinu tagi) og höfð í búrum sínum í a.m.k. fimm daga áður en gjöf skammta hefst til að láta þau aðlagast umhverfisáðstæðum á rannsóknarstofunni. Áður en meðferð hefst eru öll dýrin rannsökuð til að ganga úr skugga um að þau hafi engar sýnilegar húðskemmdir.

Tilreiðsla skömmunarlausna

10. Íðefni í föstu formi skulu leyst upp eða blönduð í sviflausn með leysum eða burðarefnum og, ef við á, þynnt áður en þau eru borin á eyru músanna. Bera má fljótandi íðefni á óblönduð eða þynnt. Óleysanleg íðefni, t.d. þau sem að jafnaði eru í lækningatækjum, skulu dregin kröftuglega út í viðeigandi leysi til að í ljós komi allir útdraganlegir efnisþættir til prófunar áður en lausnin er borin á eyru músanna. Prófunarefnið skal tilreiða daglega nema gögn um stöðugleika sýni fram á að þau þoli geymslu.

Áreiðanleikakönnun

11. Jákvæð samanburðariðefni eru notuð til að sýna fram á tilhlýðilegt nothæfi greiningarinnar með því að gefa svaranir með fullnægjandi og samanburðarnákvæmri næmni fyrir næmandi prófunarefni með svörunarstigi sem er vel lýst. Mælt er með að hafa samskeiða, jákvæðan samanburð þar eð hann sýnir fram á færni rannsóknarstofunnar til að framkvæma hverja greiningu á árangursríkan hátt og gefur færi á mati á samanburðarnákvæmni og samanburðarhæfi innan einstakra rannsóknarstofa sem og milli rannsóknarstofa. Sum stjórnvöld gera einnig kröfu um jákvæðan samanburð í hverri rannsókn og því eru notendur hvattir til að hafa samráð við viðeigandi yfirvöld áður en þeir gera BrdU-ELISA-eitlagreiningu. Til samræmis við það er hvatt til þess að samskeiða, jákvæður samanburður sé notaður að staðaldri (e. *routine use*) í því skyni að koma í veg fyrir að gera þurfi viðbótarprófanir á dýrum til að uppfylla þær kröfur sem notkun jákvæðs samanburðar með reglubundnu millibili (e. *periodic*) kann að hafa í för með sér (sjá 12. mgr.). Jákvæði samanburðurinn á að veita jákvæða svörum í BrdU-ELISA-eitlagreiningu við váhrifastyrk sem búist er við að kalli fram hækkun á örvunarstuðlinum sem nemur $\geq 1,6$ umfram neikvæða samanburðarhópinn. Skammtastærð jákvæða samanburðarinnar skal valin þannig að hún valdi ekki óhóflegri húðertingu eða altækum eiturrhifum og örvunin sé samanburðarnákvæm en ekki óhófleg (t.d. teldist örvunarstuðull sem er > 14 óhóflegur). Æskileg, jákvæð samanburðariðefni eru 25% hexýlsinnamínaldehýð (CAS-nr. 101-86-0) og 25% evgenól (CAS-nr. 97-53-0) í aseton-ólífuolíublöndu (í rúmmálshlutfallinu 4:1). Við vissar aðstæður má nota önnur jákvæð samanburðarefni sem uppfylla áðurgreindar viðmiðanir enda séu færð gild rök fyrir því.
12. Þó að mælt sé með því að hafa samskeiða, jákvæðan samanburðarhóp með í greiningunni geta reglubundnar prófanir á jákvæða samanburðinum (þ.e. með millibili sem er ≤ 6 mánuðir) verið fullnægjandi, við vissar aðstæður, fyrir rannsóknarstofur sem framkvæma reglulega BrdU-ELISA-eitlagreiningu (þ.e. framkvæma BrdU-ELISA-eitlagreiningu ekki sjáldnar en einu sinni í mánuði) og hafa komið sér upp rannsóknarsögulegum gagnagrunni um jákvæðan samanburð sem sýnir fram á getu rannsóknarstofunnar til að fá fram samanburðarnákvæmar og nákvæmar niðurstöður með jákvæðum samanburði. Hægt er að sýna fram á fullnægjandi hæfni til BrdU-ELISA-eitlagreiningar á árangursríkan hátt með því að fá fram jákvæðar niðurstöður með jákvæða samanburðinum samfelt í a.m.k. 10 sjálfstæðum prófunum sem eru gerðar innan hæfilegs tíma (þ.e. innan eins árs).
13. Alltaf skal hafa samskeiða, jákvæðan samanburðarhóp með þegar gerðar eru breytingar á tilhögun BrdU-ELISA-eitlagreiningar (t.d. breytingar á þjálfuðu starfsfólki, breytingar á efnum og/eda prófefnum í prófunaraðferðinni, breytingar á búnaði í prófunaraðferðinni eða breytingar á uppruna tilraunadýranna) og slíkar breytingar skulu skráðar í skýrslur rannsóknarstofunnar. Huga skal að áhrifum þessara breytinga á hæfni rannsóknarsögulega gagnagrunnsins, sem áður hafði verið komið á fót, þegar tekin er ákvörðun um það hvort nauðsynlegt sé að koma á fót nýjum, rannsóknarsögulegum gagnagrunni til að skrá samkvæmni í niðurstöðum úr jákvæðum samanburði.

14. Rannsakendur skulu hafa það í huga að ákvörðunin um að framkvæma rannsókn með jákvæðum samanburði með reglubundnu millibili í stað þess að hafa hann samskeiða hefur áhrif á það hvort neikvæðar rannsóknarniðurstöður, sem fást án samskeiða, jákvæðs samanburðar á tímabilinu milli reglubundinna rannsókna á jákvæða samanburðinum, teljist fullnægjandi og ásættanlegar. Ef falsneikvæðar niðurstöður fást t.d. í reglubundinni rannsókn á jákvæðum samanburði mætti draga í efa neikvæðar niðurstöður úr prófunarefni sem fást á tímabilinu milli síðustu ásættanlegu, reglubundnu rannsóknarinnar á jákvæða samanburðinum og óásættanlegu, reglubundnu rannsóknarinnar á jákvæða samanburðinum. Áhrif þessara niðurstaðna skal gaumgæfa vandlega þegar tekin er ákvörðun um hvort nota eigi samskeiða, jákvæðan samanburð eða hvort eingöngu eigi að framkvæma prófanir á jákvæðum samanburði með reglubundnu millibili. Einnig þarf að taka til athugunar að nota færri dýr í samskeiða, jákvæða samanburðarhópnum ef vísindaleg rök eru fyrir því og ef rannsóknarstofan sýnir fram á það, með rannsóknarsögulegum gögnum, sértækum fyrir rannsóknarstofuna, að hægt sé að nota færri mýs (17. heimild).
15. Þótt prófa eigi jákvæða samanburðarefnið í burðarefni sem vitað er að kallar stöðugt fram sömu svörum (t.d. í aseton-ólífuolíublöndu í rúmmálshlutfallinu 4:1) geta komið upp tilteknar aðstæður, í tengslum við reglusetningu, þar sem prófanir í óstöðluðu burðarefni (samsetningu sem skiptir máli klínískt eða efnafræðilega) eru einnig nauðsynlegar (18. heimild). Ef samskeiða, jákvæði samanburðurinn er prófaður í öðru burðarefni en prófunarefninu skal hafa sérstakan samanburðarhóp, sem fær burðarefni, fyrir samskeiða, jákvæða samanburðinn.
16. Í þeim tilvikum þegar verið er að meta prófunarefni í tilteknum iðefnaflokkum eða með tiltekið svörunarsvið geta viðmiðunarefni einnig verið gagnleg til að sýna fram á að prófunaraðferðin greini rétt húðnæmingarmátt prófunarefna af þessari gerð. Viðeigandi viðmiðunarefni skulu hafa eftirfarandi eiginleika:
 - líkindi í byggingu og virkni við efnaflokkinn sem verið er að prófa,
 - þekkt eðlisefnafræðilega eiginleika,
 - stuðningsgögn úr BrdU-ELISA-eitlagreiningu,
 - stuðningsgögn úr öðrum dýralíkönum og/eða úr mönnum.

PRÓFUNARAÐFERÐ

Fjöldi dýra og skammtastærðir

17. Nota skal a.m.k. fjögur dýr fyrir hvern skammtahóp og a.m.k. þrjú mismunandi styrkleika af prófunarefninu, svo og samskeiða, neikvæðan samanburðarhóp, sem fær einungis meðhöndlun með burðarefni prófunarefnisins, og jákvæðan samanburðarhóp (samskeiða eða nýlegan, háð stefnu rannsóknarstofunnar að því er varðar 11.–15. mgr.) Íhuga skal prófun með mismunandi skammtastærðum af jákvæða samanburðinum, einkum ef jákvæði samanburðurinn er prófaður með reglubundnu millibili. Dýrin í samanburðarhópnum skulu fá nákvæmlega sömu meðferð og dýrin í meðferðarhópnum að öðru leyti en því að þau fyrrnefndu fá ekki meðhöndlun með prófunarefninu.
18. Val á skömmtum og burðarefni skal byggjast á ráðleggingunum sem eru gefnar í 2. og 19. heimild. Samfelldir skammtar eru venjulega valdir úr viðeigandi styrkleikaröð, s.s. 100 %; 50 %; 25 %; 10 %; 5 %; 2,5 %; 1 %; 0,5 % o.s.frv. Valið á styrkleikaröðinni, sem er notuð, skal stutt fullnægjandi, vísindalegum rökum. Taka skal til athugunar allar fyrirbyggjandi eiturefnafræðilegar upplýsingar (t.d. um bráð eiturrif og húðertingu) og upplýsingar um byggingu og eðlisefnafræði prófunarefnisins sem miðað er við (og/eða efnis með skylda efnabyggingu), ef þessar upplýsingar eru tiltækar, þegar valdir eru þrjár samfelldir styrkleikar svo að mestu váhrifin verði við mesta styrkinn en komist verði hjá altækum eiturrifum og óhöflegri, staðbundinni húðertingu (19. og 20. heimild og kafla B.4 í þessum viðauka). Skorti þessar upplýsingar kann að vera nauðsynlegt að forskima í upphafi (sjá 21.–24. mgr.).
19. Burðarefni má ekki trufla eða bjaga niðurstöðuna úr prófuninni og skal valið með það að markmiði að hámarka leysnina til að fá eins háan styrk og unnt er og jafnframt lausn eða sviflausn sem hentar vel til að gefa efnið. Burðarefni, sem mælt er með, eru aseton-ólífuolíublanda (í rúmmálshlutfallinu 4:1), N,N-dímetylformamíð, metýletýlketón, própýlenglýkól og dímetyl-súlfoxíð (6. heimild) en nota má önnur burðarefni ef færð eru nægileg, vísindaleg rök fyrir því. Í sumum tilvikum getur verið nauðsynlegt að nota leysi, sem hentar út frá klínískri skírskotun, eða efnablönduna, sem prófunarefnið er selt í á markaði, sem viðbótarsamanburð. Sérstaklega þarf að sjá til þess að vatnssækin prófunarefni, sem halda húðinni votri og renna ekki strax af, séu höfð með burðarefninu með því að hafa viðeigandi uppleysandi efni með (t.d. 1% Pluronic® L92). Þess vegna ber að forðast að nota burðarefni sem eru eingöngu vatnskennð.
20. Með greiningu eitla úr einstökum músum er hægt að meta breytileika milli dýra og gera tölfræðilegan samanburð á muninum á mælingum í hópnum sem fær prófunarefni og samanburðarhópnum sem fær burðarefni (sjá 33. mgr.) Auk þess er einungis gerlegt að meta möguleikann á að fækka músum í jákvæða samanburðarhópnum ef safnað er gögnum um einstök dýr (17. heimild). Einnig krefjast sum stjórnvöld þess að gögn um einstök dýr séu tekin saman. Reglubundin söfnun gagna um einstök dýr hefur kosti með tilliti til velferðar dýra þar eð hún kemur í veg fyrir að endurtaka þurfi prófanir ef prófunarniðurstöður, sem voru upphaflega teknar saman á tiltekinn hátt (t.d. úr safngögnum um dýr), verða síðar yfirfarnar hjá stjórnvöldum sem gera aðrar kröfur (t.d. um gögn um einstök dýr).

Forskimun

21. Ef upplýsingar til ákvörðunar á stærsta skammti sem skal prófaður eru ekki fyrir hendi (sjá 18. mgr.) skal framkvæma forskimun til þess að skilgreina viðeigandi prófunarskammtastærð fyrir BrdU-ELISA-eitlagreininguna. Tilgangurinn með forskimun er að veita leiðbeiningar um val á hámarksskammtinum, sem nota skal í meginhluta BrdU-ELISA-eitlagreiningarinnar, ef upplýsingar um styrkinn, sem veldur altækum eiturrifum (sjá 24. mgr.) og/eða óhóflegri, staðbundinni húðertingu (sjá 23. mgr.), eru ekki tiltækar. Hámarksskammturinn, sem er prófaður, skal vera prófunarefnið, óþynnt ef það er fljótandi eða í mesta mögulegum styrk ef það er fast efni eða sviflausn.
22. Forskimun er framkvæmd við eins aðstæður og í meginhluta BrdU-ELISA-eitlagreiningarinnar, burtséð frá því að mati á frumufjölgun í eitlum er sleppt og hægt er að nota færri dýr í hverjum skammtahóp. Lagt er til að notuð séu eitt til tvö dýr í hverjum skammtahóp. Allar mýs eru skoðaðar daglega til að kanna hvort sjá megi einhver klínísk einkenni um altæk eiturrif eða staðbundna ertingu á áburðarstað. Líkamsþyngd er skráð fyrir prófunina og áður en prófun lýkur (6. dagur). Hörundsroði er skoðaður á báðum eyrum allra mýsa og gefin stig samkvæmt töflu 1 (20. heimild og kafli B.4 í þessum viðauka). Þykkt eyrnanna er mæld með þykktarmæli (t.d. stafrænum míkromæli eða Peacock Dial-þykktarmæli) á 1. degi (áður en prófunarefni er borið á), á 3. degi (u.þ.b. 48 tímum eftir að prófunarefni er fyrst borið á) og á 6. degi. Á 6. degi er auk þess unnt að ákvarða þykkt eyrna með vigtum sýna sem eru tekin úr eyrunum með sýnistöng eftir að dýrin hafa verið aflífuð á mannúðlegan hátt. Hörundsroðastig, sem eru ≥ 3 , og/eða eyrnaþykkt, sem er $\geq 25\%$, á einhverjum mælingadaganna benda til óhóflegrar, staðbundinnar ertingar (21. og 22. heimild). Stærsti skammturinn, sem er valinn fyrir meginhluta BrdU-ELISA-eitlagreiningarinnar, er næststærsti skammturinn í styrkröð forskimunarinnar sem veldur ekki altækum eiturrifum og/eða óhóflegri, staðbundinni húðertingu (sjá 18. mgr.).

Tafla 1

Hörundsroðastig	
Athugun	Stig
Enginn hörundsroði	0
Örlítil hörundsroði (vart sjáanlegur)	1
Greinilegur hörundsroði	2
Hörundsroði í meðallagi eða mikill	3
Mikill hörundsroði (purpuraroði) eða brunaskorpumyndun sem hindrar stigagjöf fyrir hörundsroða	4

23. Auk 25% þykkunar eyra (21. og 22. heimild) hefur tölfraðilega marktæk aukning í þykkun eyra hjá meðhöndluðum mýsum, umfram þykkun hjá mýsum í samanburði, einnig verið notuð til að greina ertandi efni í eitlagreiningunni (22.–28. heimild). En þó að tölfraðilega marktæk aukning geti orðið ef eyrnaþykkt er minni en 25% hefur hún þó ekki verið tengd sérstaklega við óhóflega ertingu (25.–29. heimild).
24. Eftirfarandi klínískar athuganir geta gefið til kynna altæk eiturrif (30. heimild), ef þær eru notaðar sem hluti af samþættu mati, og þannig verið vísbending um þann hámarksskammt sem nota skal í meginhluta BrdU-ELISA-eitlagreiningarinnar: breytingar á starfsemi taugakerfisins (t.d. hárris, slingur, skjálfti og krampi), hegðunarbreytingar (t.d. árásarhneigð, breytingar á snyrtingu, greinilegar breytingar á virkni), breytingar á öndunarmynstri (þ.e. breytingar á tíðni andardráttar og krafti öndunar, s.s. andnað, andköf og brakhljóð) og breytingar á fόδur- og vatnsneyslu. Matið skal auk þess taka tillit til merkja um sinnuleysi og/eða skort á viðbrögðum og til allra klínískra einkenna um meira en vægan eða skammlífán sársauka og þjáningar eða $> 5\%$ minnkun á líkamsþyngd frá 1. degi til 6. dags, auk dánarhlutfalls. Dauðvona dýr og dýr, sem sýna merki um mikinn sársauka og þjáningu, skal aflífa á mannúðlegan hátt (31. heimild).

Tilraunaáætlun meginrannsóknar

25. Tilraunaáætlunin fyrir greininguna er sem hér segir:
- 1. dagur: Hvert dýr skal auðkennt og vegið og þyngd þess og allar klínískar athuganir skráðar. Bornir eru 25 μ l af prófunarefninu, hæfilega þynntu, af burðarefninu eingöngu eða jákvæða samanburðinum (samskeiða eða nýlegum, háð stefnu rannsóknarstofunnar að því er varðar 11.–15. mgr.) aftan á bæði eyrun.
 - 2. og 3. dagur: Borið er aftur á dýrin eins og á 1. degi.
 - 4. dagur: Engin meðhöndlun.
 - 5. dagur: Sprautu skal inn 0,5 ml (5 mg/mús) af BrdU-laun í kviðarhol (e. *intra-peritoneally*).

- 6. dagur: Þyngd hvers dýrs og allar klínískar athuganir eru skráðar. Dýrin eru aflifuð á mannúðlegan hátt u.þ.b. 24 klukkustundum eftir innsprautun með BrdU. Dreineitlarnir eru skornir úr hvoru eyra músanna og settir, sér fyrir hvert dýr, í fosfatjafnaða saltlausn (PBS). Nákvæmar upplýsingar og skýringarmyndir af greiningu og krufningu eitla er að finna í 17. heimild. Til að vakta enn frekar staðbundna húðsvörun í meginrannsókninni er hægt að hafa viðbótarmæliþætti með í rannsóknaráætluninni, s.s. stig fyrir hörundsroða á eyra eða mælingar á þykkt eyra (fengnar annaðhvort með því að nota þykktarmæli eða með vigtnum sýna, teknum með sýnistöng úr eyrum við krufningu).

Tilreiðsla frumusviflausna

26. Fyrir hverja mús er tilreidd sviflausn með stökum eitilfrumum, skornum úr báðum eyrum, með vægri, vélrænni aðgreiningu gegnum 200 mikronmóskva net úr ryðfríu stáli eða með annarri ásættanlegri tækni til að framleiða sviflausn með stökum frumum (t.d. með því að nota einnota plaststaut til að merja eitlana og þrýsta þeim síðan gegnum 70 mikronmóskva net úr næloni.) Aðferðin við tilreiðslu eitilfrumnasviflausnar er mikilvæg í þessari greiningu og því skal hver rannsakandi ná valdi á henni fyrir fram. Eitlarnir í dýrunum í neikvæða samanburðinum eru smáir og því er mikilvægt að fara varlega til að komast hjá gervíahrifum á örvunarstuðulsgildin. Aðlaga skal markrúmmál (e. *target volume*) eitilfrumnasviflausnarinnar að ákvörðuðu kjörúmmáli í hverju einstöku tilviki (um það bil 15 ml). Kjörúmmálið miðast við að ná meðalgleypni í neikvæða samanburðarhópnum sem er innan 0,1–0,2.

Ákvörðun á frumufjölgun (mæling á BrdU-innihaldi í DNA eitilfrumna)

27. BrdU er mælt með ELISA-prófun með notkun prófunarsetts sem fæst á almennum markaði (t.d. Roche Applied Science, Mannheim, Germany, vöruskránumer 11 647 229 001). Í stuttu máli er eitilfrumnasviflausninni bætt í holurnar í flatbotna, þreföldum örbakka. Eftir bindingu og eðlissviptingu eitilfrumnasviflausnarinnar er BrdU-mótefni bætt í hverja holu og leyft að hvarfast. Síðan er BrdU-mótefnið fjarlæggt með skolun og lausninni með ensímhvarfefninu bætt við og litmyndunarefni leyft að myndast. Þá er gleypni mæld við 370 nm með 492 nm viðmiðunarbylgjulengd. Prófunaraðstæður við greininguna skulu í öllum tilvikum vera kjöraðstæður (sjá. 26. mgr.).

ATHUGANIR

Klínískar athuganir

28. Hver mús skal skoðuð gaumgæfilega a.m.k. einu sinni á dag til að kanna hvort sjá megi einhver klínísk einkenni hjá dýrunum, annaðhvort um staðbundna ertingu á áburðarstað eða altæk eiturhrif. Skrá skal allar athuganir kerfisbundið í sérstaka skrá fyrir hvert dýr. Vöktunaráætlanir skulu fela í sér viðmiðanir til að greina þegar í stað þær mys sem sýna altæk eiturhrif, óhóflega, staðbundna húðertingu eða húðætingu og skulu aflífaðar (31. heimild).

Líkamsþyngd

29. Eins og tilgreint er í 25. mgr. skal vigta hvert dýr við upphaf prófunar og þegar dýrið er aflífað á mannúðlegan hátt samkvæmt áætlun.

ÚTREIKNINGUR Á NIÐURSTÖÐUM

30. Niðurstöður fyrir hvern meðferðarhóp eru gefnar upp sem meðalörvunarstuðull. Örvunarstuðullinn er fenginn með að deila í meðaltal merkingarstuðuls BrdU (e. *BrdU labelling index*)/mús innan hvers hóps sem fær prófunarefnið og í meðaltalið innan jákvæða samanburðarhópsins með meðaltali merkingarstuðuls BrdU/mús í samanburðarhópnum sem fær leysi eða burðarefni. Meðalörvunarstuðullinn fyrir samanburðarhópin, sem fær burðarefni, er þá 1.

Merkingarstuðull BrdU er skilgreindur sem:

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

þar sem em = útgeislunarbylgjulengd (e. *emission wavelength*) og ref = viðmiðunarbylgjulengd (e. *reference wavelength*).

31. Í ákvörðunarferlinu er litið svo á að niðurstaða sé jákvæð ef örvunarstuðullinn er $\geq 1,6$ (10. heimild). Þó má einnig nota styrk tengslanna milli skammts og svörunar, tölfræðilega marktækni og samkvæmni í svörnum, sem fást með leysi eða burðarefni og jákvæða samanburðinum, við ákvörðun á því hvort líta skuli á óvissar niðurstöður (þ.e. örvunarstuðulsgildi milli 1,6 og 1,9) sem jákvæðar (3., 6. og 32. heimild).
32. Ef jákvæð svörun er óviss, með örvunarstuðul milli 1,6 og 1,9, geta notendur íhugað að nota viðbótarupplýsingar, s.s. tengslin milli skammts og svörunar, visbendingar um altæk eiturhrif eða óhóflega ertingu og, eftir því sem við á, tölfræðilega marktækni ásamt örvunarstuðulsgildum, til að staðfesta að slíkar niðurstöður séu jákvæðar (10. heimild). Einnig skal huga að ýmsum eiginleikum prófunarefnisins, þ.m.t. hvort það er skylt þekktum húðnæmum að byggingu og hvort það veldur óhóflegri húðertingu hjá músunum og hvort er eðli tengslanna sem fram koma milli skammts og svörunar. Fjallað er ítarlega um þetta og önnur atriði annars staðar (4. heimild).

33. Ef gögn eru tekin saman fyrir einstakar mýs gefur það færi á tölfræðilegri greiningu á tilvist og umfangi tengslanna milli skammts og svörunar í gögnunum. Tölfræðilegt mat getur falið í sér mat á tengslunum milli skammts og svörunar sem og samanburð á prófunarhópum sem er aðlagður á viðeigandi hátt (t.d. meðhöndlaður hópur, paraður á móti samskiða samanburðarhópi sem fær leysi eða burðarefni). Tölfræðileg greining getur t.d. falið í sér línulegt aðhvarf eða Williams-prófun, til að meta leitni í skammtasvörun, og Dunnett-prófun fyrir samanburð para. Þegar velja skal viðeigandi aðferð fyrir tölfræðilega greiningu þarf rannsakandi að vera meðvitaður um hugsanlegan ójöfnuð í dreifni og önnur skyld vandamál sem kunna að útheimta umbreytingu gagna eða tölfræðilega greiningu án breytna. Hvað sem öðru líður kann rannsakandinn að þurfa að reikna út örvunarstuðla og gera tölfræðilegar greiningar með og án tiltekinnar gagnapunkta (sem eru stundum kallaðir einfara).

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Gögn

34. Gögn skulu tekin saman í töflu sem sýnir gildi merkingarstuðuls BrdU fyrir hvert dýr, hópmeðaltal merkingarstuðuls BrdU/dýr, skekkjuliði þess (t.d. staðalfrávik, staðalskekkju meðaltalsins), og samanburð á meðalörvunarstuðli fyrir hvern skammtahóp og samskiða samanburðarhópin sem fær leysi eða burðarefni.

Prófunarskýrsla

35. Prófunarskýrslan skal innihalda eftirfarandi upplýsingar:

Prófunar- og samanburðariðefni:

- auðkennisgögn (t.d. CAS- og EB-númer, liggi þau fyrir, uppruni, hreinleiki, þekkt óhreinindi, lotunúmer),
- eðlisástand og eðlisefnafræðilegir eiginleikar (t.d. rokgirni, stöðugleiki og leysni),
- ef um blöndu er að ræða: samsetning og innbyrðis hlutfall efnisþátta.

Leysir og burðarefni:

- auðkennisgögn (hreinleiki, styrkur, ef við á, og rúmmál efnis sem er notað),
- rök fyrir vali á burðarefni.

Tilraunadýr:

- uppruni músa af stofni CBA,
- örverufræðilegt ástand dýranna, ef það er þekkt,
- fjöldi og aldur dýranna,
- uppruni dýranna, aðbúnaður, fóður o.s.frv.

Prófunaraðstæður:

- uppruni, lotunúmer og gæðatrygging framleiðanda/gögn um gæðastýringu (næmi mótefnis og sértæki og greiningarmörk) fyrir ELISA-prófunarsettið,
- upplýsingar um tilreiðslu prófunarefnis og hvernig það er borið á,
- rök fyrir vali á skömmtum (þ.m.t. niðurstöður úr forskimun ef hún er gerð),
- styrkur burðarefnis og prófunarefnis og heildarmagn prófunarefnis sem er borið á,
- upplýsingar um gæði fóðurs og vatns (þ.m.t. tegund og uppruni fóðurs og uppruni vatns),
- upplýsingar um meðferðar- og sýnatökuáætlanir,
- aðferðir við mælingar á eiturrhifum,

- viðmiðanir til að meta hvort niðurstöður rannsókna séu jákvæðar eða neikvæðar,
- upplýsingar um öll frávik frá aðferðarlýsingum og skýring á því hvaða áhrif fráviknið hefur á tilhögun og niðurstöður rannsóknarinnar.

Áreiðanleikakönnun:

- samantekt á niðurstöðum síðustu áreiðanleikakönnunar, þ.m.t. upplýsingar um prófunarefni, styrk og burðarefni,
- samskiða og/eða rannsóknarsöguleg gögn prófunarstofunnar varðandi jákvæðan samanburð og samskiða, neikvæðan samanburð (leysir eða burðarefni),
- ef samskiða, jákvæður samanburður var ekki hafður með: gögn og rannsóknarstofuskýrsla um nýjasta reglubundna, jákvæða samanburðinn og skýrsla með upplýsingum um rannsóknarsöguleg gögn um jákvæðan samanburð rannsóknarstofunnar ásamt rökum fyrir því að ekki var framkvæmdur samskiða, jákvæður samanburður.

Niðurstöður:

- þyngd hverrar músar við upphaf skömmtunar og við mannúðlega aflifun samkvæmt áætlun, sem og meðaltal og skekkjuliðir (t.d. staðalfrávik, staðalskekkja meðaltals) fyrir hvern meðferðarhóp,
- tíminn þegar eiturrifa varð vart og hvernig þau þróast, þ.m.t. húðerting, ef einhver er, á áburðarstað, fyrir hvert dýr,
- tafla yfir gildi merkingarstuðuls BrdU fyrir hvert dýr og örvunarstuðulsgildi fyrir hvern meðferðarhóp,
- meðaltal og skekkjuliðir (t.d. staðalfrávik, staðalskekkja meðaltals) BrdU merkingarstuðuls/mús fyrir hvern meðferðarhóp og niðurstöður greiningar á einförum fyrir hvern meðferðarhóp,
- útreiknaður örvunarstuðull og viðeigandi mælingar á breytileika sem taka tillit til breytileika milli dýra, bæði í prófunarefnishópum og samanburðarhópum,
- tengsl milli skammts og svörunar,
- tölfræðileg greining ef við á.

Umræða um niðurstöður.

- Stuttar athugasemdir um niðurstöður, greining á skammtasvörun og tölfræðileg greining, eftir því sem við á, með ályktun um það hvort prófunarefnið skuli teljast húðnæmir.

HEIMILDIR

- 1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Aðgengilegt á: [<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. Aðgengilegt á: [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. Aðgengilegt á: [<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. Aðgengilegt á: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRpt2009.pdf]
- 12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.*, 25, 129-134.
- 13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Aðgengilegt á: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- 14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- 15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- 16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- 17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Aðgengilegt á: [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. Aðgengilegt á: [<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. Aðgengilegt á: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>].

- 23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- 24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- 25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- 26) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- 27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.
- 28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- 29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by *Pfiesteria* extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- 30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Aðgengilegt á: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acute/tox/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. Aðgengilegt á: [<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. Aðgengilegt á: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

1. viðbætur

SKILGREININGAR

Nákvæmni: Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktu viðmiðunargildi niðurstaða úr prófun er. Nákvæmni er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferða og einn þáttur gildis (e. *relevance*). Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli rétttra niðurstaðna úr prófunaraðferð (33. heimild).

Viðmiðunarefni Efni sem er næmandi eða ekki næmandi og er notað sem viðmiðunarstaðall fyrir prófunarefni. Viðmiðunarefni skal hafa eftirfarandi eiginleika: i) einsleit og áreiðanlegan uppruna, ii) líkindi í byggingu og virkni við efnaflokkinn sem er verið að prófa, iii) þekkt eðlisefnafræðilega eiginleika, iv) stuðningsgögn um þekkt áhrif og v) þekktan mátt á sviði æskilegrar svörunar.

Falsneikvætt efni: Prófunarefni sem er ranglega greint sem neikvætt eða óvirkt með tiltekinni prófunaraðferð þegar það er í raun jákvætt eða virkt (33. heimild).

Falsjákvætt efni: Prófunarefni sem er ranglega greint sem jákvætt eða virkt með tiltekinni prófunaraðferð þegar það er í raun neikvætt eða óvirkt (33. heimild).

Hætta: Möguleikinn á skaðlegum áhrifum á heilbrigði eða skaðlegum, vistfræðilegum áhrifum. Skaðlegu áhrifin koma aðeins fram ef umfang váhrifa er nógu mikið.

Fjölsetra samanburðarnákvæmni: Mæling á því að hvaða marki mismunandi rannsóknarstofur með réttindi og hæfi, sem nota sömu aðferðarlýsingu og gera prófanir á sömu prófunarefnum, komast að niðurstöðum sem eru eigindlega og megindlega samsvarandi. Fjölsetra samanburðarnákvæmni, einnig kölluð samanburðarnákvæmni milli rannsóknarstofa, er ákvörðuð meðan á forfullgildingar- og fullgildingarferlinu stendur og gefur til kynna að hvaða marki tekst að flytja prófun með fullnægjandi hætti á milli rannsóknarstofa (33. heimild).

Einseturssamanburðarnákvæmni: Ákvörðun á því að hvaða marki fólki með réttindi og hæfi og á sömu rannsóknarstofu tekst með fullnægjandi hætti að endurtaka niðurstöður með notkun tilgreindrar aðferðarlýsingar á mismunandi tímum. Einnig kölluð samanburðarnákvæmni innan rannsóknarstofu (33. heimild).

Einfari: Einfari er mæling sem er greinilega öðruvísi en önnur gildi í slembisýni úr hópi.

Gæðatrygging: Stjórnunarferli sem felur í sér að aðilar, sem eru óháðir þeim sem framkvæma prófunina, meta fylgni við prófunarstaðla rannsóknarstofunnar, kröfur og tilhögun skráningar og áreiðanleika gagnaflutninga.

Áreiðanleiki: Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma prófunaraðferð með samanburðarnákvæmni hjá hverri rannsóknarstofu og hjá mismunandi rannsóknarstofum í tiltekinn tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Áreiðanleiki er metinn með því að reikna út einseturssamanburðarnákvæmni og fjölsetra samanburðarnákvæmni (33. heimild).

Húðnæming: Ónæmisfræðilegt ferli sem er afleiðing þess að næmur einstaklingur verður fyrir staðbundnum váhrifum frá iðefni sem er ofnæmisvaldur og framkallar ónæmissvörin í húð sem getur leitt til þróunar næmingar við snertingu.

Örvunarstuðull: Gildi til að meta húðnæmingarmátt prófunarefnis sem er reiknað út sem hlutfall á milli fjölgunar í meðhöndluðum hópum og samskeiða samanburðarhópi sem fær eingöngu burðarefni.

Prófunarefni (einnig kallað prófunariðefni): Sérhvert efni og blanda sem eru prófuð með þessari prófunaraðferð.
