

II

(Niet-wetgevingshandelingen)

VERORDENINGEN

VERORDENING (EU) Nr. 640/2012 VAN DE COMMISSIE

van 6 juli 2012

tot wijziging, in verband met de aanpassing ervan aan de technische vooruitgang, van Verordening (EG) nr. 440/2008 houdende vaststelling van testmethoden uit hoofde van Verordening (EG) nr. 1907/2006 van het Europees Parlement en de Raad inzake de registratie en beoordeling van en de autorisatie en beperkingen ten aanzien van chemische stoffen (REACH)

(Voor de EER relevante tekst)

DE EUROPESE COMMISSIE,

Gezien het Verdrag betreffende de werking van de Europese Unie,

Gezien Verordening (EG) nr. 1907/2006 van het Europees Parlement en de Raad van 18 december 2006 inzake de registratie en beoordeling van en de autorisatie en beperkingen ten aanzien van chemische stoffen (REACH), tot oprichting van een Europees Agentschap voor chemische stoffen, houdende wijziging van Richtlijn 1999/45/EG en houdende intrekking van Verordening (EEG) nr. 793/93 van de Raad en Verordening (EG) nr. 1488/94 van de Commissie alsmede Richtlijn 76/769/EEG van de Raad en de Richtlijnen 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG en 2000/21/EG van de Commissie ⁽¹⁾, en met name artikel 13, lid 3,

Overwegende hetgeen volgt:

(1) Verordening (EG) nr. 440/2008 van de Commissie ⁽²⁾ bevat de testmethoden voor de bepaling van de fysisch-chemische eigenschappen, de toxiciteit en de ecotoxiciteit van stoffen, die worden toegepast voor de uitvoering van Verordening (EG) nr. 1907/2006.

(2) Verordening (EG) nr. 440/2008 dient te worden bijgewerkt om daarin met prioriteit nieuwe en bijgewerkte, recentelijk door de OESO goedgekeurde alternatieve testmethoden op te nemen teneinde overeenkomstig Richtlijn 2010/63/EU van het Europees Parlement en de Raad

van 22 september 2010 betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt ⁽³⁾ en Richtlijn 86/609/EEG van de Raad van 24 november 1986 inzake de onderlinge aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen van de lidstaten betreffende de bescherming van dieren die voor experimentele en andere wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt ⁽⁴⁾, tot een verlaging van het aantal proefdieren te komen. De belanghebbenden zijn over dit voorstel geraadpleegd.

(3) Verordening (EG) nr. 440/2008 moet dan ook dienovereenkomstig worden gewijzigd.

(4) De bepalingen van deze verordening zijn in overeenstemming met het advies van het bij artikel 133 van Verordening (EG) nr. 1907/2006 ingestelde comité,

HEEFT DE VOLGENDE VERORDENING VASTGESTELD:

Artikel 1

De bijlage bij Verordening (EG) nr. 440/2008 wordt gewijzigd overeenkomstig de bijlage bij deze verordening.

Artikel 2

Deze verordening treedt in werking op de derde dag na die van de bekendmaking ervan in het *Publicatieblad van de Europese Unie*.

⁽¹⁾ PB L 396 van 30.12.2006, blz. 1.

⁽²⁾ PB L 142 van 31.5.2008, blz. 1.

⁽³⁾ PB L 276 van 20.10.2010, blz. 33.

⁽⁴⁾ PB L 358 van 18.12.1986, blz. 1.

Deze verordening is verbindend in al haar onderdelen en is rechtstreeks toepasselijk in elke lidstaat.

Gedaan te Brussel, 6 juli 2012.

Voor de Commissie

De voorzitter

José MANUEL BARROSO

BIJLAGE

De bijlage bij Verordening (EG) nr. 440/2008 wordt als volgt gewijzigd:

1) Hoofdstuk B.42 wordt vervangen door:

„B.42. HUIDSENSIBILISATIE: LOKALE LYMFKLIERTEST

INLEIDING

1. De OESO-richtlijnen inzake het testen van chemische stoffen (Guidelines for the Testing of Chemicals) en de daarop gebaseerde EU-testmethoden worden regelmatig herzien in het licht van de wetenschappelijke vooruitgang, zich wijzigende behoeften aan regelgeving en overwegingen met het oog op dierenwelzijn. De oorspronkelijke testmethode (TM) voor het bepalen van de huidsensibilisatie bij muizen, de lokale lymfkliertest (LLKT; OESO-testrichtlijn 429; hoofdstuk B.42 van deze bijlage) werd eerder goedgekeurd (1). Er zijn publicaties verschenen met de gegevens over de validering van de LLKT en een overzicht van gerelateerd onderzoek (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). De bijgewerkte LLKT is gebaseerd op de evaluatie van ervaringen en wetenschappelijke gegevens (12). Dit is de tweede TM die is ontworpen om de potentiële huidsensibilisatie door chemische stoffen (stoffen en mengsels) bij dieren te bepalen. Bij de andere TM (d.w.z. OESO-testrichtlijn 406; hoofdstuk B.6 van deze bijlage) worden cavia's gebruikt: de maximalisatietest en de Buehlertest (13). De LLKT biedt ten opzichte van B.6 en OESO-testrichtlijn 406 (13) voordelen op het gebied van dierenwelzijn. Deze bijgewerkte LLKT-testmethode omvat een reeks prestatienormen (aanhangel 1) die gebruikt kunnen worden om de valideringsstatus te evalueren van de nieuwe en/of gewijzigde testmethoden die in functioneel en mechanistisch opzicht vergelijkbaar zijn met de LLKT, overeenkomstig de beginselen van OESO-leidraad nr. 34 (14).
2. De LLKT bestudeert de inductiefase van huidsensibilisatie en levert kwantitatieve gegevens op die voor een dosis/responsbepaling kunnen worden gebruikt. Opgemerkt dient te worden dat de milde/gematigde sensibilisatoren die worden aanbevolen als geschikte chemische stoffen voor positieve controle bij tests met cavia's (d.w.z. B. 6; OESO-testrichtlijn 406) (13) ook geschikt zijn om bij de LLKT te worden gebruikt (6) (8) (15). Een benadering gericht op vermindering van het proefdiergebruik (verminderde LLKT (vLLKT)), die kan leiden tot een vermindering van het proefdiergebruik met wel 40 %, wordt in deze TM tevens als een optie beschreven (16) (17) (18). De vLLKT kan worden gebruikt indien op grond van regelgeving een noodzaak bestaat om een negatieve prognose van het huidsensibilisatiepotentieel te bevestigen, op voorwaarde dat aan alle andere specificaties van het LLKT-protocol wordt voldaan, zoals beschreven in deze TM. De prognose van een negatief resultaat moet gebaseerd zijn op alle beschikbare informatie als bedoeld in punt 4. Voordat de vLLKT-benadering wordt toegepast, moeten een duidelijke rechtvaardiging en een wetenschappelijke motivering voor de toepassing ervan worden overgelegd. Indien in de vLLKT, tegen de verwachtingen in, een positief of moeilijk te interpreteren resultaat wordt verkregen, kunnen aanvullende tests nodig zijn om de bevinding te interpreteren of te verduidelijken. De vLLKT mag niet worden gebruikt om gevaren van stoffen die worden gebruikt in huidsensibilisatietests te signaleren indien dosis/responsinformatie nodig is, zoals in het geval van de onderverdeling voor Verordening (EG) nr. 1272/2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels en het mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen van de Verenigde Naties.

DEFINITIES

3. Gebruikte definities worden gegeven in aanhangsel 2.

TOELICHTING EN BEPERKINGEN

4. De LLKT is een alternatieve methode die kan worden gebruikt om potentiële huidsensibilisatie door chemische stoffen te signaleren. Dit houdt niet noodzakelijkerwijs in dat de LLKT in alle gevallen in plaats van de proef met cavia's moet worden gebruikt (d.w.z. B.6; OESO-testrichtlijn 406) (13), maar veeleer dat de test gelijkwaardig is en als alternatief kan worden gebruikt, waarbij positieve en negatieve resultaten niet langer behoeven te worden bevestigd. Het testlaboratorium moet vóór de uitvoering van het onderzoek alle beschikbare informatie over de teststof in overweging nemen. Dergelijke informatie omvat tevens de identiteit en chemische structuur van de teststof; de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof; de uitkomsten van eventuele andere met de teststof in vitro of in vivo uitgevoerde toxiciteitstests; en toxicologische gegevens betreffende structureel verwante chemische stoffen. Deze informatie moet in overweging worden genomen om te bepalen of de LLKT geschikt is voor de stof (gezien de incompatibiliteit van sommige soorten chemische stoffen met de LLKT, zie punt 5) en om de dosis beter te kunnen vaststellen.
5. De LLKT is een in-vivomethode en leidt er derhalve niet toe dat er bij de bepaling van allergische contactsensibilisatie geen dieren meer worden gebruikt. Het is echter wel mogelijk dat het aantal daarvoor gebruikte dieren wordt beperkt. Bovendien zorgt de LLKT voor een aanzienlijke verfijning (minder pijn en leed) van de manier waarop dieren voor het testen op allergische contactsensibilisatie worden gebruikt. De LLKT is gebaseerd op het onderzoek van immunologische gebeurtenissen die tijdens de inductiefase van sensibilisatie door chemische stoffen worden gestimuleerd. In tegenstelling tot de proeven met cavia's (d.w.z. B.6; OESO-testrichtlijn 406) (13) behoeven bij de LLKT geen door provocatie geïnduceerde overgevoelighedsreacties van de huid te worden opgewekt. Bovendien hoeft bij de LLKT geen adjuvans te worden gebruikt, hetgeen bij de maximalisatietest bij cavia's wel nodig is (13). Dit betekent dat de pijn en het ongerief voor dieren bij de LLKT geringer zijn. Ondanks de voordelen van de LLKT ten opzichte van B.6 en OESO-testrichtlijn 406 moet worden gesteld dat er

bepaalde beperkingen zijn waardoor het gebruik van B.6 of OESO-testrichtlijn 406 (13) nodig kan zijn (bijvoorbeeld valsnegatieve resultaten bij de LLKT met bepaalde metalen of valspositieve resultaten met bepaalde stoffen die de huid irriteren [zoals bepaalde soorten oppervlakteactieve chemische stoffen] (19) (20), of de oplosbaarheid van de teststof). Daarnaast kan in het geval van chemische klassen of stoffen die functionele groepen bevatten waarvan is aangetoond dat ze als potentiële stoofactoren (21) werken, het gebruik van proeven met *cavia's* (d.w.z. B.6; OESO-testrichtlijn 406) (13) nodig zijn. Ook bestaat er bij de LLKT, op basis van de databank van stoffen met beperkte validering, die hoofdzakelijk uit pesticideformuleringen bestond, een hogere kans op een positieve uitkomst voor deze soorten teststoffen dan bij proeven met *cavia's* (22). Echter, het is het overwegen waard om soortgelijke stoffen met bekende uitkomsten als referentiestoffen te gebruiken, teneinde aan te tonen dat de LLKT correct functioneert (zie punt 16). Afgezien van dergelijke bekende beperkingen zou de LLKT toepasbaar moeten zijn voor het testen van alle stoffen, tenzij deze stoffen eigenschappen hebben die de nauwkeurigheid van de LLKT negatief kunnen beïnvloeden.

PRINCIPE VAN DE TEST

6. Het beginsel dat aan de LLKT ten grondslag ligt, is dat sensibilisatoren de proliferatie induceren van lymfocyten in de lymfklieren die de afvoer verzorgen van de plaats waar de teststof wordt aangebracht. Deze proliferatie is evenredig met de dosis en de potentie van het aangebrachte allergeen en biedt een eenvoudige mogelijkheid om een kwantitatieve meting van de sensibilisatie uit te voeren. De proliferatie wordt gemeten door de gemiddelde proliferatie in iedere testgroep te vergelijken met de gemiddelde proliferatie in de met medium behandelde controlegroepen. De verhouding tussen de gemiddelde proliferatie bij iedere behandelde groep en bij de gelijktijdige medium-controlegroep wordt bepaald en deze zogenaamde stimuleringsindex moet minimaal drie zijn, voordat het gerechtvaardigd is om de teststof in te delen als potentiële huidsensibilisator. De hier beschreven procedures zijn gebaseerd op het gebruik van in vivo radioactieve markering om een toegenomen aantal delende cellen in de afvoerende lymfklieren te meten. Echter, ook andere eindpunten voor de bepaling van het aantal delende cellen kunnen worden gebruikt, mits volledig wordt voldaan aan de prestatienormvereisten (aanhangsel 1).

BESCHRIJVING VAN DE TEST

Keuze van de diersoort

7. Voor deze test worden bij voorkeur muizen gebruikt. Er worden jonge volwassen vrouwtjesmuizen van de CBA/Ca- of CBA/J-stam gebruikt, die nog geen jongen hebben gehad en niet drachtig zijn. Bij het begin van het onderzoek moeten de dieren 8-twaalf weken oud zijn; het gewichtsverschil tussen de dieren moet minimaal zijn en de afwijking mag niet groter zijn dan 20 % van het gemiddelde gewicht. Er mogen ook andere stammen of mannetjes worden gebruikt, wanneer er voldoende gegevens beschikbaar zijn om aan te tonen dat er geen significante stam- en/of geslachtsspecifieke verschillen in de LLKT-respons zijn.

Huisvesting en voeding

8. De muizen moeten in groepjes worden ondergebracht (23), tenzij een individuele behuizing van de muizen naar behoren wetenschappelijk wordt gemotiveerd. De temperatuur van de proefdierruimte dient 22 ± 3 °C te zijn. De relatieve luchtvochtigheid moet ten minste 30 % en (behalve tijdens het schoonmaken van de ruimte) bij voorkeur niet hoger dan 70 % zijn, maar er moet worden gestreefd naar 50-60 %. Er moet gebruik worden gemaakt van kunstlicht met een cyclus van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater.

Vorbereiding van de dieren

9. De dieren worden aselect ingedeeld, gemerkt om elk dier afzonderlijk te kunnen identificeren (maar niet door enigerlei vorm van oormerking) en vóór het begin van de toediening gedurende minimaal vijf dagen in hun kooi gehouden om ze aan de omstandigheden in het laboratorium te laten wennen. Vóór het begin van de behandeling worden alle dieren onderzocht om vast te stellen dat ze geen waarneembaar huidletsel hebben.

Bereiding van de doseeroplossingen

10. Vaste chemische stoffen moeten in oplosmiddelen/media worden opgelost of gesuspenderd en, indien nodig, verdund vóór aanbrenging op een oor van de muis. Vloeibare chemische stoffen kunnen onverdund worden toegediend of vóór de toediening worden verdund. Onoplosbare chemische stoffen, zoals die gewoonlijk voorkomen in medische apparaten, moeten worden onderworpen aan een maximale extractie in een geschikt oplosmiddel om alle extraheerbare bestanddelen voor het testen vrij te maken vóór aanbrenging op een oor van de muis. Teststoffen moeten dagelijks worden geprepareerd, tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is.

Betrouwbaarheidscontrole

11. Voor positieve controle gebruikte stoffen (PC's) worden gebruikt om aan te tonen dat de test correct werkt in de zin dat de test leidt tot een respons met voldoende en reproduceerbare gevoeligheid, waarbij de omvang van de respons goed gedocumenteerd is. Gelijktijdig gebruik van een PC wordt aanbevolen, omdat hiermee wordt aangetoond dat het laboratorium de competentie bezit om iedere test succesvol uit te voeren en omdat de intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid en -overdraagbaarheid hiermee kan worden beoordeeld. Een PC voor iedere studie wordt ook vereist door sommige regelgevende autoriteiten en derhalve worden gebruikers aangeemoedigd de relevante autoriteiten te raadplegen alvorens de LLKT uit te voeren. Derhalve wordt het routinematige

gelijktijdig gebruik van een PC aangemoedigd, zodat geen noodzaak bestaat om aanvullende dierproeven uit te voeren om te voldoen aan dergelijke vereisten die kunnen voortkomen uit het gebruik van een periodieke PC (zie punt 12). De PC moet een positieve LLKT-respons opleveren bij een blootstellingsniveau waarbij in vergelijking met de negatieve controlegroep een stijging van de SI met > 3 wordt verwacht. De dosis van de PC moet zo worden gekozen dat de stof geen overmatige huidirritatie of systemische toxiciteit veroorzaakt en de inductie reproduceerbaar is, maar niet buitensporig (d.w.z. een SI > 20 zou buitensporig zijn). Bij voorkeur moeten 25 % hexylcinnamaldehyde (Chemical Abstracts Service [CAS] nr. 101-86-0) in aceton: olijfolie (4:1, v/v) en 5 % mercaptobenzothiazool (CAS-nr. 149-30-4) in N,N-dimethylformamide worden gebruikt (zie aanhangsel 1, tabel 1). Onder bepaalde omstandigheden kunnen andere PC's worden gebruikt die aan bovengenoemde criteria voldoen, mits een afdoende motivering wordt gegeven.

12. Hoewel het gelijktijdig gebruik van een PC-groep aanbevolen wordt, kunnen er situaties zijn waarin periodiek testen (d.w.z. met intervallen $\leq$ zes maanden) van de PC toereikend kan zijn voor laboratoria die de LLKT regelmatig uitvoeren (d.w.z. de LLKT uitvoeren met een frequentie van niet minder dan eenmaal per maand) en die een historische PC-databank hebben die aantoont dat het laboratorium in staat is om reproduceerbare en nauwkeurige uitkomsten met PC's te verkrijgen. Toereikende ervaring met de LLKT kan worden aangetoond door consequent positieve uitkomsten te genereren in ten minste tien onafhankelijke tests die binnen een redelijke tijdsperiode (d.w.z. binnen één jaar) worden uitgevoerd.
13. Gelijktijdig gebruik van een PC-groep is verplicht in geval van een procedurewijziging in de LLKT (bv. wijziging van gekwalificeerd personeel, wijziging in de materialen en/of reagentia van de testmethode, wijziging van de testapparatuur, wijziging van de bron van proefdieren), en dergelijke wijzigingen moeten in laboratoriumverslagen worden gedocumenteerd. Het effect van dergelijke wijzigingen op de nauwkeurigheid van de eerder opgerichte historische databank moet in overweging worden genomen om te bepalen of het nodig is een nieuwe historische databank op te richten, teneinde consistentie in de documentatie van de PC-uitkomsten te waarborgen.
14. Onderzoekers dienen zich ervan bewust te zijn dat de beslissing om een PC-onderzoek op periodieke basis uit te voeren in plaats van gelijktijdig, consequenties heeft voor de nauwkeurigheid en aanvaardbaarheid van negatieve onderzoeksuitkomsten die zijn gegenereerd zonder gelijktijdig gebruik van een PC tijdens het interval tussen opeenvolgende periodieke PC-onderzoeken. Indien bijvoorbeeld een valsnegatieve uitkomst is verkregen in het periodieke PC-onderzoek, kunnen negatieve resultaten voor teststoffen die zijn verkregen in het interval tussen het laatste aanvaardbare periodieke PC-onderzoek en het onaanvaardbare PC-onderzoek in twijfel worden getrokken. De implicaties van deze uitkomsten moeten zorgvuldig in overweging worden genomen om te bepalen of PC's gelijktijdig moeten worden gebruikt of dat alleen periodieke PC-onderzoeken moeten worden uitgevoerd. Tevens moet overwogen worden om minder dieren te gebruiken in de gelijktijdige PC-groep, indien dit wetenschappelijk gerechtvaardigd is en indien het laboratorium aantoont, op basis van laboratoriumspecifieke historische gegevens, dat minder muizen gebruikt kunnen worden (12).
15. Hoewel de PC moet worden getest in een medium waarvan bekend is dat het een consequente respons oplevert (bv. aceton: olijfolie; 4:1, v/v), kan de regelgeving in bepaalde gevallen vereisen dat de tests ook in een ongebruikelijk medium (een klinisch/chemisch relevante formulering) worden uitgevoerd (24). Indien de gelijktijdig gebruikte PC in een ander medium wordt getest dan de teststof, moet een afzonderlijke met medium behandelde groep voor de gelijktijdig gebruikte PC worden gebruikt.
16. In gevallen waarin teststoffen van een specifieke chemische klasse of bereik van responsen worden geëvalueerd, kunnen referentiestoffen ook nuttig zijn om aan te tonen dat de testmethode correct functioneert voor het signaleren van het huidsensibilisatiepotentieel van deze soorten stoffen. Geschikte referentiestoffen moeten de volgende eigenschappen hebben:
 - ze moeten structureel en functioneel vergelijkbaar zijn met de klasse van de teststof die wordt getest;
 - hun fysische/chemische kenmerken moeten bekend zijn;
 - uit de LLKT afkomstige gegevens ondersteunen;
 - uit andere diermodellen en/of van mensen afkomstige gegevens ondersteunen.

UITVOERING VAN DE PROEF

Aantal dieren en hoogte van de doses

17. Er worden minimaal vier dieren per dosagroep gebruikt en ten minste drie concentraties van de teststof plus een negatieve controlegroep (NC-groep), die alleen met het medium voor de teststof wordt behandeld, en een PC (gelijktijdig of recentelijk uitgevoerd, op basis van het laboratoriumbeleid zoals beschreven in de punten 11-15). Het testen van meerdere doses van de PC moet overwogen worden, in het bijzonder wanneer de PC op periodieke basis wordt getest. Behalve dat de dieren in de controlegroepen niet met de teststof worden behandeld, worden ze verder op identieke wijze behandeld als de dieren in de behandelde groepen.

18. De keuze van de doses en het medium wordt gebaseerd op de aanbevelingen in de referenties (3) en (5). Opeenvolgende doses worden doorgaans gekozen uit een geschikte concentratiereeks, zoals 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % enz. Aan de keuze van de gebruikte concentratiereeks moet een toereikende wetenschappelijke motivering ten grondslag liggen. Bij de keuze van de drie opeenvolgende concentraties moet rekening worden gehouden met alle bestaande toxicologische gegevens (bv. met betrekking tot acute toxiciteit en huidirritatie), wanneer die beschikbaar zijn, zodat bij de hoogste concentratie de blootstelling maximaal is zonder dat dit tot systemische toxiciteit en bovenmatige lokale huidirritatie leidt (3) (25). Wanneer dergelijke informatie niet beschikbaar is, kan een initiële voorafgaande screeningtest nodig zijn (zie punten 21-24).
19. Het medium mag het testresultaat niet verstoren of er invloed op uitoefenen en moet worden gekozen met het oog op de hoogste mate van oplosbaarheid, zodat de hoogst mogelijke concentratie wordt verkregen, terwijl de oplossing/suspensie geschikt moet zijn om de teststof mee aan te brengen. Aanbevolen media zijn aceton: olijfolie (4:1, v/v), N,N-dimethylformamide, methylethylketon, propyleenglycol en dimethylsulfoxide (19), maar ook een ander medium mag worden gebruikt als daarvoor een afdoende wetenschappelijke motivering wordt gegeven. In bepaalde gevallen kan het nodig zijn als extra controle een klinisch relevant oplosmiddel te gebruiken of de commerciële formulering waarin de teststof in de handel wordt gebracht. Er moet vooral voor worden gezorgd dat hydrofiele teststoffen worden opgenomen in een medium dat de huid vochtig maakt en niet onmiddellijk wegloopt. Dit kan worden bereikt door geschikte oplosbaar makende stoffen (bv. 1 % Pluronic® L92) toe te voegen. Een volledig waterig medium moet derhalve worden vermeden.
20. Door de verwerking van lymfklieren van individuele muizen kan de spreiding over de dieren worden beoordeeld en kan een statistische vergelijking tussen de teststofmetingen en de metingen voor de met medium behandelde controlegroep worden uitgevoerd (zie punt 35). Daarnaast kan door het verzamelen van gegevens met betrekking tot individuele dieren de mogelijkheid onderzocht worden om het aantal muizen in de PC-groep te verminderen (12). Verder vereisen sommige regelgevende autoriteiten het verzamelen van gegevens met betrekking tot individuele dieren. Niettemin kunnen gepoolde diergegevens aanvaardbaar zijn voor bepaalde regelgevende autoriteiten en in dergelijke situaties kunnen gebruikers mogelijk kiezen of ze individuele of gepoolde diergegevens verzamelen.

Voorafgaande screeningtest

21. Wanneer er geen gegevens beschikbaar zijn om de hoogste te testen dosis te bepalen (zie punt 18), moet een voorafgaande screeningtest worden uitgevoerd om de juiste dosis te bepalen die in de LLKT getest moet worden. Het doel van de voorafgaande screeningtest is om richtsnoeren te bieden voor het kiezen van de maximale dosis in het hoofdonderzoek van de LLKT, indien informatie over de concentratie die systemische toxiciteit induceert (zie punt 24) en/of bovenmatige huidirritatie (zie punt 23) niet beschikbaar is. De maximale dosis die wordt getest, moet 100 % zijn van de teststof voor vloeibare stoffen of de hoogst mogelijke concentratie voor vaste stoffen of suspensies.
22. De voorafgaande screeningtest wordt uitgevoerd onder omstandigheden die identiek zijn aan die van het hoofdonderzoek van de LLKT, behalve dat er geen beoordeling is van de lymfklierproliferatie en er minder dieren per dosisgroep kunnen worden gebruikt. Aanbevolen wordt per dosisgroep een of twee dieren te gebruiken. Alle muizen worden dagelijks geobserveerd op klinische verschijnselen van systemische toxiciteit of op lokale irritatie op de plaats van aanbrengen. Het lichaamsgewicht van de dieren wordt geregistreerd voorafgaand aan de test en vóór de beëindiging van de test (dag 6). Beide oren van iedere muis worden onderzocht op erytheem en de responsen worden ingeschaald met behulp van tabel 1 (25). De dikte van de oren wordt gemeten met behulp van een diktemeter (bv. een digitale micrometer of een Peacock Dial-diktemeter) op dag 1 (vóór aanbrenging van de dosis), dag 3 (ongeveer 48 uur na de eerste dosis) en dag 6. Daarnaast kan op dag 6 de dikte worden bepaald door oorperforatiemetingen, die uitgevoerd moeten worden nadat de dieren op humane wijze zijn gedood. Bovenmatige huidirritatie wordt aangegeven door een erytheemscore ≥ 3 en/of een toename van de oordikte ≥ 25 % op een of meer van de meetdagen (26) (27). De hoogste dosis die voor het hoofdonderzoek van de LLKT wordt gekozen, is de volgende lagere dosis in de concentratiereeks van de voorafgaande screeningtest (zie punt 18) die geen systemische toxiciteit en/of bovenmatige huidirritatie veroorzaakt.

Tabel 1

Erytheemscores

Waarneming	Score
Geen erytheem	0
Zeer licht erytheem (nauwelijks waarneembaar)	1
Duidelijk gedefinieerd erytheem	2
Matig tot ernstig erytheem	3
Ernstig erytheem (diep rood) tot korstvorming waardoor de inschaling van erytheem onmogelijk is	4

23. Naast een toename van de oordikte met 25 % (26) (27), is een statistisch significante toename van de oordikte bij de behandelde muizen in vergelijking met de controlemuizen ook gebruikt om irriterende stoffen in de LLKT te signaleren (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Echter, hoewel statistisch significante toenames kunnen voorkomen bij een toename van de oordikte met minder dan 25 %, worden ze niet specifiek met bovenmatige huidirritatie in verband gebracht (30) (32) (33) (34).
24. De volgende klinische waarnemingen kunnen duiden op systemische toxiciteit (35) (36) wanneer gebruikt als onderdeel van een geïntegreerde beoordeling en kunnen derhalve de maximale dosis aangeven die in het hoofdonderzoek van de LLKT moet worden gebruikt: veranderingen in de werking van het zenuwstelsel (bv. pilo-erectie, ataxie, tremors en convulsies); veranderingen in gedrag (bv. agressiviteit, verandering in lichaamsverzorging, duidelijke verandering in het activiteitsniveau); veranderingen in ademhalingspatronen (bv. veranderingen in de frequentie en intensiteit van het ademen, zoals kortademigheid, benauwdheid en gereutel) en veranderingen in de voedsel- en waterconsumptie. Daarnaast moet in de evaluatie rekening worden gehouden met tekenen van lethargie en/of gebrek aan reactiviteit alsmede klinische tekenen van meer dan lichte of voorbijgaande pijn en leed of een vermindering van het lichaamsgewicht van meer dan 5 % tussen dag 1 en dag 6, evenals het sterftecijfer. Stervende dieren of dieren die duidelijk pijn hebben of tekenen van hevig en voortdurend leed vertonen, moeten op humane wijze worden gedood (37).

Proefopzet hoofdonderzoek

25. De proefopzet van het onderzoek is als volgt:

- *Dag 1:* Van elk dier apart wordt het gewicht en iedere klinische waarneming bepaald en vastgelegd. Vervolgens wordt 25 µl van de verdunning van de teststof, het medium zonder teststof of de positieve controle (gelijktijdig of recent, op basis van het in de punten 11-15 beschreven beleid), open aangebracht op het dorsum van elk oor.
- *Dagen 2 en 3:* Herhaal de aanbrengprocedure van dag 1.
- *Dagen 4 en 5:* Geen behandeling.
- *Dag 6:* Van elk dier wordt het gewicht vastgelegd. Injecteer bij de muizen van alle test- en controlegroepen 250 µl PBS (phosphate-buffered saline) die 20 µCi ($7,4 \times 10^5$ Bq) tritiumhoudende (^3H)-methylthymidine bevat in de staartader. Een andere mogelijkheid is injectie van 250 µl PBS die 2 µCi ($7,4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I -jooddeoxyuridine en 10^{-5}M fluorodeoxyuridine bevat bij alle muizen in de staartader. Vijf uur (5 u) later worden de dieren op humane wijze gedood. De afvoerende auriculaire lymfklieren van elk oor worden uitgedroogd en voor ieder dier afzonderlijk gepoold in PBS (individuele aanpak); het is ook mogelijk de lymfklieren van elk oor uit te prepareren en in PBS te poolen voor iedere behandelgroep (groepsgewijze aanpak). Referentie (12) bevat gedetailleerde informatie en diagrammen voor de identificatie en het uitprepareren van de lymfklieren. Om de lokale huidreacties in het hoofdonderzoek nader te onderzoeken, kunnen aanvullende parameters in het onderzoeksprotocol worden opgenomen, zoals de inschaling van oorerythem of oordiktemetingen (verreken door gebruik van een diktemeter of door oorperforatiemetingen bij de necropsie).

Bereiding van de celsuspensies

26. Er wordt een eencellige suspensie gemaakt met lymfklieren van aparte dieren of van gepoolde groepen door het weefsel voorzichtig door een roestvrij stalen gaas met een maaswijdte van 200 µm te persen of met behulp van een andere acceptabele techniek voor het genereren van een eencellige suspensie. De lymfklieren worden tweemaal gewassen met een overmaat PBS en het DNA wordt neergeslagen met 5 % trichloorazijnzuur (TCA) bij 4 °C gedurende 18 uur (3). Het neerslag wordt geresuspendeerd in 1 ml TCA en voor ^3H -telling overgebracht in scintillatie-telflesjes die 10 ml scintillatievloeistof bevatten, of direct overgebracht in gamma-telbuizen voor ^{125}I -telling.

Bepaling van celproliferatie (opgenomen radioactiviteit)

27. De opname van ^3H -methylthymidine wordt gemeten door β -scintillatietelling als desintegraties per minuut (DPM). De opname van ^{125}I -jooddeoxyuridine wordt gemeten door ^{125}I -telling en ook als DPM uitgedrukt. Afhankelijk van de gevolgde werkwijze wordt de opname uitgedrukt als DPM/muis (individuele aanpak) of DPM/behandelingsgroep (groepsgewijze aanpak).

Verminderde LLKT

28. In bepaalde situaties, wanneer er op grond van regelgeving een noodzaak bestaat om een negatieve voorspelling van het huidsensibilisatiepotentieel te bevestigen, kan een optioneel protocol voor verminderde LLKT (vLLKT) (16) (17) (18) met gebruikmaking van minder dieren worden gebruikt, op voorwaarde dat aan alle andere LLKT-protocolspecificaties in deze TM wordt voldaan. Voordat de vLLKT-benadering wordt toegepast, moeten een duidelijke rechtvaardiging en een wetenschappelijke motivering voor de toepassing ervan worden overgelegd. Als een positief of moeilijk te interpreteren uitkomst wordt verkregen, kan het nodig zijn om aanvullende tests uit te voeren om de bevinding te interpreteren of te verduidelijken.

29. De vermindering van het aantal dosisgroepen is het enige verschil tussen de LLKT- en de vLLKT-testmethode-protocollen en derhalve levert de vLLKT geen dosis/responsgegevens op. Dit betekent dat de vLLKT niet mag worden gebruikt indien dosis-responsgegevens benodigd zijn. Zoals bij de LLKT met meerdere doses, moet de teststofconcentratie die bij de vLLKT wordt beoordeeld de maximale concentratie zijn die geen duidelijke systemische toxiciteit en/of bovenmatige huidirritatie bij de muis veroorzaakt (zie punt 18).

WAARNEMINGEN

Klinische waarnemingen

30. Iedere muis wordt ten minste één keer per dag zorgvuldig geobserveerd op klinische verschijnselen van lokale irritatie op de plaats van aanbrengen of systemische toxiciteit. Alle waarnemingen worden systematisch geregistreerd en van elke muis wordt een apart overzicht bijgehouden. Waarnemingsschema's dienen criteria te omvatten om muizen die tekenen vertonen van systemische toxiciteit, overmatige lokale huidirritatie of huidcorrosie onmiddellijk aan te wijzen voor euthanasie (37).

Lichaamsgewicht

31. Zoals in punt 25 is vermeld, wordt aan het begin van de test en wanneer de dieren volgens schema op humane wijze worden gedood, van elk dier het lichaamsgewicht bepaald.

BEREKENING VAN RESULTATEN

32. De resultaten voor iedere behandelingsgroep worden uitgedrukt als de stimuleringsindex (SI). Bij de individuele aanpak wordt de SI berekend door de gemiddelde DPM/muis van elke groep behandeld met teststof en de positieve controlegroep, te delen door de gemiddelde DPM/muis voor de medium-controlegroep. De gemiddelde SI voor de met medium behandelde controles is dan 1. Bij de groepsgewijze aanpak wordt de SI berekend door de totale opname van radioactiviteit voor elke behandelde groep te delen door de totale opname van radioactiviteit voor de medium-controlegroep; dit levert een gemiddelde SI op.
33. Binnen het beslissingsproces wordt een resultaat als positief beschouwd, indien $SI \geq 3$. Echter, de sterkte van de dosis/respons, de statistische significantie en de consistentie van de medium-controlegroep- en PC-responsen kunnen ook worden gebruikt om te bepalen of een resultaat dat een grensgeval is, positief wordt verklaard (4) (5) (6).
34. Als de verkregen resultaten onduidelijk zijn, moet worden gekeken naar verschillende eigenschappen van de teststof, bijvoorbeeld of deze qua structuur verwant is met bekende huidsensibilisatoren, of de stof overmatige huidirritatie veroorzaakt en wat de aard van de waargenomen dosis/responsverhouding is. Deze en andere overwegingen worden elders gedetailleerd besproken (7).
35. Door radioactiviteitsgegevens te verzamelen op het niveau van de individuele muis, kan een statistische analyse worden uitgevoerd voor het bestaan van een dosis/responsverhouding binnen de gegevens en de mate waarin deze verhouding voorkomt. Iedere statistische beoordeling kan een evaluatie omvatten van de dosis/responsverhouding evenals afdoende aangepaste vergelijkingen van testgroepen (bv. paarsgewijs gedoseerde groep tegenover vergelijkingen van een gelijktijdig met medium behandelde controlegroep). Statistische analyses kunnen bijvoorbeeld lineaire regressie omvatten of de test van William voor het beoordelen van dosis/responstrends, alsmede de test van Dunnett voor paarsgewijze vergelijkingen. Bij het kiezen van een geschikte statistische analysemethode moet de onderzoeker zich bewust blijven van mogelijke variantie-heterogeniteit en andere soortgelijke problemen, die een gegevenstransformatie of een niet-parametrische statistische analyse noodzakelijk kunnen maken. In ieder geval kan het nodig zijn dat de onderzoeker SI-berekeningen en statistische analyses uitvoert met en zonder bepaalde gegevenspunten (soms „uitbijters” genoemd).

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

36. Gegevens moeten in tabelvorm worden samengevat. Bij de individuele aanpak moeten de DPM-waarden voor individuele dieren worden weergegeven, alsmede de gemiddelde DPM/dier per groep, het bijbehorende residu (bv. SD, SEM), en de gemiddelde SI voor iedere dosisgroep in vergelijking met de gelijktijdig met medium behandelde controlegroep. Bij gebruik van de benadering voor gepoolde behandelingsgroepen moet de gemiddelde/mediane DPM en de gemiddelde SI voor iedere dosisgroep in vergelijking met de gelijktijdig met medium behandelde controlegroep worden weergegeven.

Testverslag

37. In het testverslag wordt de volgende informatie opgenomen:

Test- en controlestoffen:

- identificatiegegevens (bv. CAS- en EG-nummers, indien beschikbaar; bron; zuiverheid; bekende onzuiverheden; partijnummer);
- de fysische aard en de fysisch-chemische eigenschappen (bv. de vluchtigheid, de stabiliteit en de oplosbaarheid);

- bij een mengsel de samenstelling met voor elk bestanddeel het procentuele gehalte;

Oplosmiddel/medium:

- identificatiegegevens (zuiverheid; concentratie, indien van toepassing; gebruikt volume);
- motivering van de keuze van het medium;

Proefdieren:

- bron van CBA-muizen;
- microbiologische status van de dieren, indien bekend;
- aantal en leeftijd van de dieren;
- de herkomst van de dieren, de huisvesting, de voeding enz.;

Testomstandigheden:

- gedetailleerde gegevens over de formulering en het aanbrengen van de teststof;
- motivering voor dosiskeuze (met inbegrip van resultaten van voorafgaande screeningtest, indien uitgevoerd);
- gebruikte concentraties van medium en teststof en totale hoeveelheid teststof die is aangebracht;
- gedetailleerde gegevens over de kwaliteit van het voer en het water (waaronder de aard en de herkomst van het voer en de herkomst van het water);
- gedetailleerde gegevens met betrekking tot het behandelings- en bemonsteringsschema;
- methoden voor de meting van de toxiciteit;
- criteria om te bepalen of het resultaat positief of negatief is;
- gedetailleerde gegevens met betrekking tot protocolafwijkingen en een uitleg van hoe de afwijking van invloed is op de opzet en resultaten van het onderzoek;

Betrouwbaarheidscontrole:

- overzicht van de resultaten van de meest recente betrouwbaarheidscontrole met informatie over de teststof, de concentratie en het gebruikte medium;
- tegelijkertijd en/of in het verleden bepaalde positieve en negatieve controlegegevens voor het testlaboratorium;
- indien geen gelijktijdige PC is uitgevoerd, de datum en het laboratoriumverslag voor de meest recente periodieke PC en een verslag met de historische PC-gegevens voor het laboratorium waarin de beslissing om geen gelijktijdige PC uit te voeren, wordt gemotiveerd;

Resultaten:

- het gewicht van elke muis aan het begin van de test en wanneer deze volgens schema wordt gedood; evenals het gemiddelde bijbehorende residu (bv. SD, SEM) voor iedere behandelingsgroep;
- voor elk dier het tijdstip waarop de eventuele toxiciteitsverschijnselen zich voordoen, met inbegrip van huidirritatie op de toedieningsplaats, en het verloop daarvan;
- een tabel met de DPM-waarden van individuele muizen (individuele aanpak per dier) of de gemiddelde/mediane DPM-waarden (groepswijze aanpak) en de SI-waarden voor iedere behandelingsgroep;

- gemiddeld bijbehorend residu (bv. SD, SEM) voor de DPM/muis voor elke behandelingsgroep en de resultaten van uitbijteranalyses voor elke behandelingsgroep bij toepassing van de individuele aanpak per dier;
- berekende SI en een geschikte meting van de variabiliteit die rekening houdt met de spreiding over de dieren in zowel de teststof- als de controlegroepen bij toepassing van de individuele benadering per dier;
- dosis/responsverhouding;
- statistische analyses, indien van toepassing;

Bespreking van de resultaten:

- een korte bespreking van de resultaten, de dosis/respons-analyse en de statistische analyses, indien van toepassing, met een conclusie ten aanzien van de vraag of de teststof als huidsensibilisator moet worden beschouwd.

LITERATUUR

- (1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Available at: [<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. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStd.pdf]
- (13) OECD (1992), Skin Sensitisation. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Available at: [<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. Available at: [<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. Available at: [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. Available at: [<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. Available at: [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, Available at: [<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. Available at: [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. Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fdLLNA/BRDcomplete.pdf>]

- (28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- (31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- (32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.
- (33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfisteria extract, *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Available at: [<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, Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm
- (37) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

Aanhangsel 1

Prestatienormen voor beoordeling van voorgestelde soortgelijke of gewijzigde LLKT-testmethoden voor huidsensibilisatie

INLEIDING

1. Prestatienormen zijn bedoeld om mee te delen op welke grondslag kan worden vastgesteld dat nieuwe testmethoden, zowel niet-generieke methoden (d.w.z. methoden die beschermd zijn door het auteursrecht, die een handelsmerk hebben en die geregistreerd zijn) als generieke methoden, bepaald kunnen worden teneinde voldoende nauwkeurigheid en betrouwbaarheid te bieden voor specifieke testdoeleinden. Deze prestatienormen, die gebaseerd zijn op gevalideerde en geaccepteerde testmethoden, kunnen worden gebruikt om de betrouwbaarheid en nauwkeurigheid te beoordelen van andere soortgelijke methoden (informeel „me too“-tests genoemd) die gebaseerd zijn op soortgelijke wetenschappelijke principes en die hetzelfde biologische of toxische effect meten of voorspellen (14).
2. Voordat gewijzigde methoden (d.w.z. voorgestelde potentiële verbeteringen van een goedgekeurde testmethode) gebruikt kunnen worden, moet een evaluatie worden uitgevoerd ter bepaling van het effect van de voorgestelde wijzigingen op de prestaties van de test en de mate waarin dergelijke wijzigingen de informatie beïnvloeden die beschikbaar is voor de andere componenten van het valideringsproces. Afhankelijk van de aard van de voorgestelde wijzigingen en hun aantal, de gegenereerde gegevens en ondersteunende documentatie voor deze wijzigingen, moeten ze onderworpen worden aan hetzelfde valideringsproces als het voor een nieuwe test beschreven proces of, indien van toepassing, aan een beperkte beoordeling van betrouwbaarheid en relevantie met gebruikmaking van geaccepteerde prestatienormen (14).
3. Soortgelijke of gewijzigde methoden die worden voorgesteld voor gebruik binnen deze TM moeten worden geëvalueerd om hun betrouwbaarheid en nauwkeurigheid te bepalen met gebruikmaking van chemische stoffen die het volledige bereik van de LLKT-scores vertegenwoordigen. Teneinde onnodig gebruik van dieren te voorkomen, wordt ten stelligste aanbevolen dat modelontwikkelaars de relevante autoriteiten raadplegen, voordat zij valideringsonderzoeken starten overeenkomstig de prestatienormen en richtsnoeren die deze TM bevat.
4. Deze prestatienormen zijn gebaseerd op de geharmoniseerde prestatienorm op basis van ICCVAM (Verenigde Staten), ECVAM (EU) en JaCVAM (Japan) (12), voor de evaluatie van de validiteit van soortgelijke of gewijzigde versies van de LLKT. De prestatienorm bestaat uit essentiële componenten van de testmethode, aanbevolen referentiestoffen en nauwkeurigheds- en betrouwbaarheidsnormen waaraan de voorgestelde methode moet voldoen of die de voorgestelde methode moet overtreffen.

I. Essentiële componenten van de testmethode

5. Om te waarborgen dat een soortgelijke of gewijzigde LLKT-methode in functioneel en mechanistisch opzicht vergelijkbaar is met de LLKT en hetzelfde biologische effect meet, moeten de volgende componenten in het protocol van de testmethode worden opgenomen:

- De teststof moet plaatselijk worden aangebracht op beide oren van de muis;
- De proliferatie van lymfocyten moet worden gemeten in de lymfklieren die de afvoer verzorgen van de plaats waar de teststof wordt aangebracht;
- De proliferatie van lymfocyten moet worden gemeten tijdens de inductiefase van huidsensibilisatie;
- Voor teststoffen moet de hoogste gekozen dosis de maximale concentratie zijn die geen systemische toxiciteit en/of bovenmatige lokale huidirritatie bij de muis veroorzaakt. Voor positieve referentiestoffen moet de hoogste dosis minimaal zo hoog zijn als de LLKT EC3-waarden van de overeenkomstige referentiestoffen (zie tabel 1) zonder systemische toxiciteit en/of bovenmatige lokale huidirritatie bij de muis te veroorzaken;
- Een gelijktijdige controlegroep moet in elk onderzoek worden opgenomen en er moet, indien van toepassing, tevens een gelijktijdige PC worden gebruikt;
- Per dosisgroep moeten minimaal vier dieren worden gebruikt;
- De gegevens kunnen worden verzameld van elk dier apart of van gepoolde groepen.

Indien aan een van deze criteria niet wordt voldaan, kunnen deze prestatienormen niet worden gebruikt om de soortgelijke of gewijzigde methode te valideren.

II. Minimumlijst van referentiestoffen

6. De geharmoniseerde prestatienorm op basis van ICCVAM, ECVAM en JaCVAM (12) bevat een minimumlijst van 18 referentiestoffen die gebruikt moeten worden en vier optionele referentiestoffen (d.w.z. stoffen die valspositieve of valsnegatieve uitkomsten gaven in de LLKT in vergelijking met de resultaten van tests met mensen en cavia's (B.6 of OESO-testrichtlijn 406) (13) en die derhalve de mogelijkheid bieden om gelijkwaardige of betere prestaties dan de LLKT aan te tonen) die zijn opgenomen in de prestatienormen voor de LLKT. De selectiecriteria voor de aanwijzing van deze chemische stoffen waren:

- de lijst van referentiestoffen kwam overeen met de soorten stoffen die doorgaans getest worden op huidsensibilisatiepotentieel en met het bereik van de responsen dat de LLKT kan meten of voorspellen;
- de stoffen hadden goed gedefinieerde chemische structuren;
- LLNA-gegevens van tests met cavia's (d.w.z. B.6; OESO-testrichtlijn 406) (13) en, zo mogelijk, gegevens van tests met mensen waren voor iedere stof beschikbaar; en
- de stoffen waren gemakkelijk verkrijgbaar via een commerciële bron.

De aanbevolen referentiestoffen worden vermeld in tabel 1. Onderzoeken die gebruikmaken van de aanbevolen referentiestoffen moeten geëvalueerd worden in het medium waarmee ze worden vermeld in tabel 1. In situaties waarin een stof op de lijst niet verkrijgbaar is, mogen andere stoffen die aan de selectiecriteria voldoen, worden gebruikt, mits met een afdoende motivering.

Tabel 1

Aanbevolen referentiestoffen voor de prestatienormen van de LLKT

Nummer	Chemische stoffen ⁽¹⁾	CAS-nr.	Toestand	Med ⁽²⁾	EC3 % ⁽³⁾	N ⁽⁴⁾	0,5x - 2,0x EC3	Werkelijk EC3-bereik	LLKT vs. CT	LLKT vs. test bij mensen
1	5-chloor-2-methyl-4-isothiazoline-3-on (CMI)/2-methyl-4-isothiazoline-3-on (MI) ⁽⁵⁾	26172-55-4/2682-20-4	Vlb	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NB	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Vast	AOO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-fenyleendiamine	106-50-3	Vast	AOO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Kobaltchloride	7646-79-9	Vast	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Iso-eugenol	97-54-1	Vlb	AOO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-mercaptobenzothiazool	149-30-4	Vast	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NB	+/+	+/+
7	Citral	5392-40-5	Vlb	AOO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Vlb	AOO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Eugenol	97-53-0	Vlb	AOO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Fenylbenzoaat	93-99-2	Vast	AOO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Cinnamylalcohol	104-54-1	Vast	AOO	21	1	10,5-42	NB	+/+	+/+
12	Imidazolidinylureum	39236-46-9	Vast	DMF	24	1	12-48	NB	+/+	+/+
13	Methylmethacrylaat	80-62-6	Vlb	AOO	90	1	45-100	NB	+/+	+/+
14	Chloorbenzeen	108-90-7	Vlb	AOO	25	1	n.v.t.	n.v.t.	-/-	-/ (*)
15	Isopropanol	67-63-0	Vlb	AOO	50	1	n.v.t.	n.v.t.	-/-	-/+
16	Melkzuur	50-21-5	Vlb	DMSO	25	1	n.v.t.	n.v.t.	-/-	-/ (*)
17	Methylsalicylaat	119-36-8	Vlb	AOO	20	9	n.v.t.	n.v.t.	-/-	-/-
18	Salicylzuur	69-72-7	Vast	AOO	25	1	n.v.t.	n.v.t.	-/-	-/-

Nummer	Chemische stoffen ⁽¹⁾	CAS-nr.	Toestand	Med ⁽²⁾	EC3 % ⁽³⁾	N ⁽⁴⁾	0,5x - 2,0x EC3	Werkelijk EC3-bereik	LLKT vs. CT	LLKT vs. test bij mensen
Optionele stoffen om betere prestaties ten opzichte van de LLKT aan te tonen										
19	Natriumlaurylsulfaat	151-21-3	Vast	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/-	+/-
20	Ethyleenglycoldimethacrylaat	97-90-5	Vlb	MEK	28	1	14-56	NB	+/-	+/+
21	Xyleen	1330-20-7	Vlb	AOO	95,8	1	47,9-100	NB	+ / (**)	+/-
22	Nikkel(II)chloride	7718-54-9	Vast	DMSO	5	2	n.v.t.	n.v.t.	-/+	-/+

Afkortingen: AOO = aceton: olijfolie (4:1, v/v); CAS-nr. = nummer bij de Chemical Abstracts Service (CAS); DMF = N,N-dimethylformamide; DMSO = dimethylsulfoxide; DNCB = 2,4-dinitrochlorobenzene; EC3 = geschatte concentratie die nodig is om een stimuleringsindex van 3 te genereren; CT = resultaat van caviatest (d.w.z. B.6 of OESO-testrichtlijn 406) (13) HCA = hexylcinnamaldehyde; Vlb = vloeibaar; LLNA = resultaat van lokale lymfkliertest (d.w.z. B.42 of OESO-testrichtlijn 429) (1); MEK = methylethylketon; N.v.t. = niet van toepassing, omdat stimuleringsindex < 3; NB = niet berekend, omdat gegevens werden verkregen uit één onderzoek; Med = medium.

(*) aangezien deze stof wordt verondersteld niet sensibiliserend te werken bij mensen vanwege het feit dat er geen resultaten van tests met provocatiepleisters beschikbaar zijn, is de stof niet opgenomen als een stof die geschikt is voor tests met provocatiepleisters; daarnaast zijn er geen gevallen van sensibilisatie bij mensen bekend.

(**) geen gegevens van caviatests beschikbaar.

(1) Chemische stoffen moeten dagelijks worden geprepareerd, tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is.

(2) Vanwege het potentiële effect van verschillende media op de prestaties van de LLKT, moet voor iedere referentiestof het aanbevolen medium worden gebruikt (24) (32).

(3) Gemiddelde waarde, indien meer dan één EC3-waarde beschikbaar was. Voor negatieve stoffen (d.w.z. met stimuleringsindex < 3) wordt de hoogste concentratie die getest is, gegeven.

(4) Aantal LLKT-onderzoeken waaruit gegevens werden verkregen.

(5) In de handel verkrijgbaar als Kathon CG (CAS-nr. 55965-84-9), dat een mengsel van CMI en MI is in de verhouding 3:1. De relatieve concentraties van elke component gaan van 1,1 % tot 1,25 % (CMI) en van 0,3 % tot 0,45 % (MI). De inactieve componenten zijn magnesiumzouten (21,5 % tot 24 %) en kopernitraat (0,15 % tot 0,17 %), waarbij de resterende formulering bestaat uit 74 % tot 77 % water. Kathon CG is gemakkelijk verkrijgbaar via Sigma-Aldrich en Rohm and Haas (nu Dow Chemical Corporation).

III. Gedefinieerde betrouwbaarheids- en nauwkeurigheidsnormen

7. De nauwkeurigheid van een soortgelijke of gewijzigde LLKT-methode moet gelijk zijn aan of beter zijn dan die van de prestatienorm voor de LLKT, wanneer de test beoordeeld wordt met gebruikmaking van de 18 referentiestoffen die gebruikt moeten worden. De nieuwe of gewijzigde methode moeten resulteren in de correcte indeling op basis van een „ja/nee”-beslissing. Het kan echter voorkomen dat de nieuwe of gewijzigde methode niet alle stoffen op de minimumlijst van referentiestoffen correct indeelt. Indien bijvoorbeeld een van de zwakke sensibilisatoren onjuist wordt ingedeeld, kunnen een motivering voor de onjuiste indeling en relevante aanvullende gegevens (d.w.z. testresultaten die tot correcte indelingen leiden voor andere stoffen met fysieke, chemische en sensibilisatie-eigenschappen die vergelijkbaar zijn met die van de onjuist ingedeelde stof) geacht worden gelijkwaardige prestaties aan te tonen. In dergelijke omstandigheden zou de valideringsstatus van de nieuwe of gewijzigde LLKT-testmethode van geval tot geval worden beoordeeld.

Intralaboratoriumreproduceerbaarheid

8. Om de intralaboratoriumreproduceerbaarheid te bepalen, moet een nieuwe of gewijzigde LLKT-methode worden beoordeeld met gebruikmaking van een sensibiliserende stof waarvan de eigenschappen bekend zijn binnen de LLKT. Derhalve zijn de prestatienormen voor de LLKT gebaseerd op de variabiliteit van de resultaten van herhaalde tests met hexylcinnamaldehyde (HCA). Om de intralaboratoriumbetrouwbaarheid te beoordelen, moeten de grenswaarden voor de geschatte concentratie voor HCA verkregen worden op vier afzonderlijke tijdstippen met ten minste een week tussen de tests. Aanvaardbare intralaboratoriumreproduceerbaarheid wordt aangetoond door het vermogen van een laboratorium om in iedere HCA-test grenswaarden voor de geschatte concentratie te verkrijgen van 5 % tot 20 %, hetgeen staat voor het bereik van 0,5 tot 2,0 maal de gemiddelde EC3 die voor HCA (10 %) wordt gespecificeerd in de LLKT (zie tabel 1).

Interlaboratoriumreproduceerbaarheid

9. Interlaboratoriumreproduceerbaarheid van een nieuwe of gewijzigde LLKT-testmethode moet worden beoordeeld met behulp van twee sensibilisatoren waarvan de eigenschappen voldoende bekend zijn binnen de LLKT. De prestatienormen voor de LLKT zijn gebaseerd op de variabiliteit van de resultaten van tests met HCA en 2,4-dinitrochlorobenzeen (DNCB) in verschillende laboratoria. De grenswaarden voor de geschatte concentratie moeten onafhankelijk verkregen worden uit één onderzoek dat in ten minste drie afzonderlijke laboratoria wordt uitgevoerd. Om aanvaardbare interlaboratoriumreproduceerbaarheid aan te tonen, moet ieder laboratorium grenswaarden voor de geschatte concentratie (EC) verkrijgen van 5 % tot 20 % voor HCA en van 0,025 % tot 0,1 % voor DNCB, wat overeenkomt met het bereik van 0,5 tot 2,0 maal de gemiddelde EC3-concentraties die zijn gespecificeerd voor respectievelijk HCA (10 %) en DNCB (0,05 %) in de LLKT (zie tabel 1).

Aanhangsel 2

Definities

Nauwkeurigheid: de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de testmethode en erkende referentiewaarden. Het is een maat voor de prestaties van de testmethode en één aspect van relevantie. Deze term en de term „concordantie”, waaronder het percentage correcte uitkomsten van een testmethode wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt (14).

Ijkstof: een sensibiliserende of niet-sensibiliserende stof die gebruikt wordt als norm voor vergelijking met een teststof. Een ijkstof moet de volgende eigenschappen hebben: i) consistente en betrouwbare bron(nen); ii) in structureel en functioneel opzicht soortgelijk aan de geteste klasse stoffen; iii) bekende fysisch-chemische eigenschappen; iv) ondersteunende gegevens met betrekking tot bekende effecten, en v) bekende potentie binnen het bereik van de gewenste respons.

Drempelwaarde voor de geschatte concentratie: geschatte concentratie van een teststof die nodig is om een stimuleringsindex te genereren die duidt op een positieve respons.

Geschatte concentratie drie (EC3): Geschatte concentratie van een teststof die nodig is om een stimuleringsindex van drie te genereren.

Valsnegatief: een teststof die door een testmethode ten onrechte als negatief of niet-actief wordt geïdentificeerd, terwijl de stof feitelijk positief of actief is.

Valspositief: een teststof die ten onrechte als positief of actief wordt geïdentificeerd, terwijl de stof in feite negatief of niet-actief is.

Gevaar: het risico van een nadelig effect op de gezondheid of het milieu. Het nadelige effect doet zich alleen voor indien er voldoende blootstelling is.

Interlaboratoriumreproduceerbaarheid: een maatstaf voor de mate waarin verschillende gekwalificeerde laboratoria die gebruikmaken van hetzelfde protocol en die dezelfde teststoffen testen, in kwalitatief en kwantitatief opzicht vergelijkbare resultaten kunnen produceren. De interlaboratoriumreproduceerbaarheid wordt bepaald tijdens de prevaliderings- en valideringsprocessen en geeft aan in hoeverre een test met succes tussen laboratoria kan worden overgedragen; dit wordt ook wel reproduceerbaarheid tussen laboratoria genoemd (14).

Intralaboratoriumreproduceerbaarheid: een bepaling van de mate waarin gekwalificeerde mensen binnen hetzelfde laboratorium met succes resultaten kunnen repliceren met gebruikmaking van een specifiek protocol op verschillende tijdstippen. Dit wordt ook reproduceerbaarheid binnen laboratoria genoemd (14).

„Me too”-test: een informele uitdrukking voor een testmethode die in structureel en functioneel opzicht vergelijkbaar is met een gevalideerde en geaccepteerde testmethode. Een dergelijke testmethode zou geschikt zijn voor inhaalvalidering. Dit is een alternatieve benaming voor gelijksoortige testmethode (14).

Uitbijter: een uitbijter is een waarneming die duidelijk afwijkt van andere waarden binnen een willekeurige steekproef uit een populatie.

Prestatienormen: normen, gebaseerd op een gevalideerde referentiemethode, die de basis vormen voor de beoordeling van de vergelijkbaarheid van een voorgestelde, in mechanistisch en functioneel opzicht gelijksoortige testmethode. Hieronder begrepen zijn: i) essentiële componenten van de testmethode; ii) een minimumlijst van referentiestoffen die zijn gekozen uit de stoffen die zijn gebruikt om de aanvaardbare prestaties van de gevalideerde referentiemethode aan te tonen; en iii) de nauwkeurigheids- en betrouwbaarheidsniveaus die door de voorgestelde testmethode moeten worden gehaald wanneer ze worden beoordeeld aan de hand van de minimumlijst van referentiestoffen; deze waarden zijn gebaseerd op de waarden die voor de gevalideerde testmethode zijn verkregen (14).

Niet-generieke testmethode: een testmethode waarvan de productie en distributie beperkt worden door octrooien, auteursrechten, handelsmerken enz.

Kwaliteitsborging: een beheerproces waarbij de naleving van de testnormen, eisen en boekhoudingsprocedures voor laboratoria alsmede de nauwkeurigheid van de gegevensoverdracht worden beoordeeld door personen die onafhankelijk zijn van degenen die de tests uitvoeren.

Referentiestoffen: chemische stoffen die gebruikt worden in het valideringsproces, waarvan de responsen in het in-vitro- of in-vivoreferentieteststelsel of de doelsoort reeds bekend zijn. Deze chemische stoffen moeten representatief zijn voor de klassen van chemische stoffen waarvoor de testmethode zal worden gebruikt en moeten het volledige bereik van responsen bestrijken dat verwacht kan worden van de chemische stoffen waarvoor de test gebruikt zal worden, van sterk tot zwak, tot negatief. Het kan nodig zijn om verschillende reeksen referentiestoffen te gebruiken voor de verschillende fasen van het valideringsproces en voor verschillende testmethoden en -doelstellingen (14).

Relevantie: beschrijving van het verband van de test met het te onderzoeken effect en of de test betekenis heeft en nuttig is voor een bepaald doel. Het is de mate waarin de test het te onderzoeken biologische effect correct meet of voorspelt. Relevantie omvat een beoordeling van de nauwkeurigheid (concordantie) van een testmethode (14).

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een testmethode, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden toegepast. De betrouwbaarheid wordt beoordeeld door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid (14).

Huidsensibilisatie: een immunologisch proces dat ontstaat wanneer een vatbare persoon of proefdier plaatselijk wordt blootgesteld aan een inducerend chemisch allergeen, dat een immunologische huidreactie veroorzaakt die kan leiden tot de ontwikkeling van contactsensibilisatie.

Stimuleringsindex (SI): een waarde die wordt berekend om het huidsensibilisatiepotentieel van een teststof te beoordelen en die gelijk is aan de verhouding van de proliferatie bij behandelde groepen ten opzichte van de proliferatie bij de gelijktijdig met medium behandelde controlegroep.

Teststof: iedere stof of ieder mengsel die/dat met deze TM wordt getest.

Gevalideerde testmethode: een testmethode waarvoor valideringsonderzoeken werden gedaan om de relevantie (inclusief nauwkeurigheid) en betrouwbaarheid voor een bepaald doel te bepalen. Er dient te worden opgemerkt dat een gevalideerde testmethode niet per definitie voldoende nauwkeurig en betrouwbaar is om aanvaardbaar te worden bevonden voor het voorgestelde doel (14)."

2) Hoofdstuk B.46 wordt vervangen door:

„B.46. IN-VITROHUIDIRRITATIE: TESTMETHODE MET GERECONSTRUEERDE HUMANE EPIDERMIS

INLEIDING

1. Onder huidirritatie wordt verstaan: het ontstaan van reversibele weefselschade aan de huid na het aanbrengen van een testmateriaal gedurende maximaal vier uur (zoals gedefinieerd in het GHS (Globally Harmonised System for Classification and Labelling of Chemicals, mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen van de Verenigde Naties) en Verordening (EG) nr. 1272/2008 van het Europees Parlement en de Raad van 16 december 2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels, de zogeheten CLP-Verordening (1)(3)). Deze testmethode bevat een in-vitroprocedure die gebruikt kan worden om de gevaren van irriterende chemische stoffen (stoffen en mengsels) te identificeren in overeenstemming met het VN-GHS en de EU-CLP-categorie 2 (1) (2) (3). In de EU en andere regio's die niet de optionele GHS-categorie 3 (licht irriterende stoffen) hebben aangenomen, kan deze TM ook worden gebruikt om chemische stoffen te identificeren die niet zijn ingedeeld, d.w.z. stoffen in de VN-GHS- en EU-CLP-categorie „Geen categorie” (1)(3). Deze TM kan worden gebruikt om de door chemische stoffen veroorzaakte huidirritatie te bepalen als een zelfstandige vervangende test voor in-vivohuidirritatietests binnen een teststrategie met verschillende niveaus (4 en hoofdstuk B.4 in deze bijlage).

2. De bepaling van de huidirritatie ging meestal gepaard met het gebruik van proefdieren [OESO-testrichtlijn 404; hoofdstuk B.4 in deze bijlage] (4). In verband met bezorgdheid ten aanzien van dierenwelzijn is B.4 in 2004 herzien, waarbij de bepaling van huidcorrosie/-irritatie wordt uitgevoerd door een teststrategie met meerdere niveaus toe te passen, met gebruikmaking van gevalideerde in-vitro- of ex-vivotestmethoden, ter voorkoming van pijn en leed bij dieren. Drie gevalideerde in-vitrotestmethoden zijn aangenomen als OESO-testrichtlijnen 430, 431 en 435 (5) (6) (7) en twee methoden zijn als de hoofdstukken B.40 en B.40 bis in deze bijlage opgenomen, die bedoeld zijn om gebruikt te worden voor het corrosiviteitsgedeelte van de teststrategie met meerdere niveaus van B.4 of OESO-testrichtlijn 404 (4).
3. Deze TM heeft betrekking op huidirritatie als eindpunt voor de menselijke gezondheid. De methode is gebaseerd op gereconstrueerde humane epidermis (RhE), die qua algemeen ontwerp (het gebruik van uit mensen verkregen niet-getransformeerde epidermiskeratinocyten als celbron en het gebruik van representatief weefsel en cytoarchitectuur) nauwe overeenkomsten heeft met de biochemische en fysiologische eigenschappen van de bovenste delen van de menselijke huid, d.w.z. de epidermis. Deze TM omvat tevens een reeks prestatienormen (aanhangel 2) voor de beoordeling van soortgelijke en gewijzigde RhE-gebaseerde methoden die zijn ontwikkeld door EC-ECVAM (8), in overeenstemming met de beginselen van OESO-richtsnoer nr. 34 (9).
4. Er zijn drie gevalideerde methoden die voldoen aan de eisen van deze TM. Prevaliderings-, optimaliserings- en valideringsonderzoeken zijn afgerond voor een in-vitromethode (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), met gebruikmaking van een RhE-model, die in de handel verkrijgbaar is als EpiSkinTM (aangeduid als de Validated Reference Method (VRM), gevalideerde referentiemethode). Twee andere in de handel verkrijgbare in vitro uitgevoerde huidirritatietestmethoden op basis van RhE hebben soortgelijke resultaten opgeleverd als de VRM overeenkomstig op prestatienormen gebaseerde validering (21), en dit zijn de RhE-methoden EpiDermTM SIT (EPI-200) en SkinEthicTM (22).
5. Voordat een voorgestelde soortgelijke of gewijzigde in-vitro-RhE-methode anders dan de RhE-methoden VRM, EpiDermTM SIT (EPI-200) of SkinEthicTM kan worden gebruikt voor gereguleerde doeleinden, moeten de betrouwbaarheid, relevantie (nauwkeurigheid) en beperkingen ervan voor het voorgestelde gebruik bepaald worden om te waarborgen dat de methode als vergelijkbaar met de VRM kan worden beschouwd, overeenkomstig de vereisten van de in deze TM vastgestelde prestatienormen (aanhangel 2). Daarnaast wordt aanbevolen de OESO-toelichting (OECD Explanatory Background Document) inzake in vitro uitgevoerde huidirritatietests te raadplegen alvorens een soortgelijke of gewijzigde in-vitro-RhE-methode te ontwikkelen, te valideren en in te dienen voor wettelijke goedkeuring (23).

DEFINITIES

6. Gebruikte definities worden gegeven in aanhangsel 1.

TOELICHTING EN BEPERKINGEN

7. Zoals het valideringsonderzoek (16) aantoont, bevat de TM de beperking dat de chemische stoffen niet kunnen worden ingedeeld in de optionele GHS-categorie 3 (licht irriterende stoffen) (1). Indien de methode wordt gebruikt als een gedeeltelijk vervangende test, kan het nodig zijn aanvullende in-vivotests uit te voeren om het huidirritatiepotentieel volledig te karakteriseren (4 en hoofdstuk B.4 van deze bijlage). Voor het gebruik van menselijke huid gelden nationale en internationale ethische overwegingen en voorwaarden.
8. Deze TM heeft betrekking op de in-vitrohuidirritatiecomponent van de teststrategie met meerdere niveaus van B.4 (OESO-testrichtlijn 404) inzake huidcorrosie/-irritatie (4). Hoewel deze TM geen toereikende informatie over huidcorrosie oplevert, moet worden opgemerkt dat B.40 bis (OESO-testrichtlijn 431) betreffende huidcorrosie gebaseerd is op hetzelfde RhE-testsysteem, maar met gebruikmaking van een ander protocol (hoofdstuk B.40 bis). Deze methode is gebaseerd op RhE-modellen die gebruikmaken van menselijke keratinocyten, die derhalve in vitro het doelorgaan van het te onderzoeken bestanddeel vertegenwoordigen. Bovendien heeft de methode direct betrekking op de eerste fase van de inflammatoire reactie/het werkingsmechanisme (celbeschadiging en weefselbeschadiging leidend tot plaatselijk trauma) die tijdens irritatie in vivo plaatsvindt. Een brede reeks chemische stoffen is getest binnen het onderliggende valideringsproces voor deze TM en de empirische databank van het valideringsonderzoek bevat in totaal 58 chemische stoffen (16)(18)(23). Dit is van toepassing op vaste stoffen, vloeibare stoffen, halfvaste stoffen en wassen. De vloeibare stoffen mogen waterig of niet-waterig zijn; vaste stoffen mogen oplosbaar of niet oplosbaar in water zijn. Indien mogelijk moeten vaste stoffen tot een poeder worden vernalen, voordat ze worden aangebracht; geen andere voorbehandeling van het monster is vereist. Gassen en aerosols zijn nog niet gevalideerd in een valideringsonderzoek (24). Hoewel het denkbaar is dat deze met behulp van RhE-technologie kunnen worden getest, staat de huidige TM het testen van gassen en aerosols niet toe. Tevens dient opgemerkt te worden dat sterk gekleurde chemische stoffen de metingen van levensvatbaarheid van cellen kunnen verstoren en het bij deze stoffen nodig is aangepaste controles te gebruiken met het oog op correcties (zie punten 24-26).
9. Een test bestaande uit drie gerepliceerde weefsels zou voldoende moeten zijn voor een teststof, indien de indeling ervan ondubbelzinnig is. Echter, bij grensgevallen zoals niet-concordante metingen van replicaties en/of een gemiddeld levensvatbaarheidspercentage van $50 \pm 5\%$, moet een tweede test worden overwogen, evenals een derde test in geval van niet-concordante resultaten tussen de eerste twee tests.

PRINCIPE VAN DE TEST

10. De teststof wordt plaatselijk aangebracht op een driedimensionaal RhE-model dat bestaat uit niet-getransformeerde, uit mensen verkregen epidermiskeratinocyten, die gekweekt zijn om een meerlagig, hooggedifferentieerd model van de menselijke epidermis te vormen. Het model bestaat uit een georganiseerd *stratum basale*, *stratum spinosum* en *stratum granulosum*, en een meerlagig *stratum corneum*, die intercellulaire lamelvormige lipidelagen bevatten die representatief zijn voor de belangrijkste lipideklassen, analoog aan die in vivo worden aangetroffen.

11. Door chemische stoffen geïnduceerde huidirritatie, die zich manifesteert als erytheem en oedeem, is het gevolg van een cascade van gebeurtenissen, beginnend met de penetratie van de *stratum corneum* en beschadiging van de onderliggende keratinocyten. Uit de afstervende keratinocyten komen mediators vrij die de inflammatoire cascade veroorzaken die inwerkt op de cellen in de *dermis*, in het bijzonder de stroma- en endotheliale cellen. Het zijn de dilatatie en verhoogde permeabiliteit van de endotheliale cellen waardoor de waargenomen erytheem en oedeem ontstaan (24). De op RhE gebaseerde methoden meten de initiërende gebeurtenissen in de cascade.
12. De levensvatbaarheid van cellen wordt gemeten door enzymatische omzetting van de vitale kleurstof MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromide, thiazolylblauw; CAS-nummer 298-93-1) in een blauw formazaanzout dat kwantitatief wordt gemeten na extractie uit weefsels (25). Irriterende chemische stoffen worden geïdentificeerd op hun vermogen om de levensvatbaarheid van cellen te reduceren tot minder dan gedefinieerde drempelwaarden (d.w.z. $\leq 50\%$, voor GHS-/CLP-categorie 2). Afhankelijk van het regelgevend kader waarin de resultaten van deze TM worden gebruikt, kunnen chemische stoffen die leiden tot een levensvatbaarheid van cellen van meer dan de gedefinieerde grenswaarde beschouwd worden als niet-irriterende stoffen (d.w.z. $> 50\%$, geen categorie).

AANTONING VAN BEKWAAMHEID

13. Voordat de drie gevalideerde methoden die aan deze TM voldoen, routinematig worden gebruikt, moeten laboratoria technische bekwaamheid aantonen, met gebruikmaking van de tien referentiestoffen die in tabel 1 worden vermeld. Voor soortgelijke methoden die op grond van deze TM worden ontwikkeld of voor wijzigingen van enige van de drie gevalideerde methoden, moet aan de in aanhangsel 2 van deze TM beschreven prestatienormen worden voldaan, voordat de methode wordt gebruikt voor gereguleerde tests.
14. Als onderdeel van deze bekwaamheidsdemonstratie wordt aanbevolen dat de gebruiker na ontvangst de door de fabrikant van het RhE-model gespecificeerde barrière-eigenschappen van de weefsels verifieert. Dit is in het bijzonder van belang indien weefsels over lange afstanden/gedurende lange perioden zijn vervoerd. Zodra een methode met succes is opgezet en de bekwaamheid in het gebruik ervan is aangetoond, hoeft een dergelijke verificatie niet routinematig te worden uitgevoerd. Echter, indien een methode routinematig wordt gebruikt, wordt aanbevolen om de barrière-eigenschappen op regelmatige basis te blijven toetsen.

Tabel 1

Referentiestoffen ⁽¹⁾

Chemische stof	CAS-nr.	In-vivoscore ⁽²⁾	Fysische toestand	VN-GHS-/EU-CLP-categorie
Naftaleenazijnzuur	86-87-3	0	vast	geen cat.
isopropanol	67-63-0	0,3	vloeibaar	geen cat.
Methylstearaat	112-61-8	1	vast	geen cat.
Heptylbutyraat	5870-93-9	1,7	vloeibaar	geen cat. (optionele cat. 3) ⁽³⁾ ⁽⁴⁾
Hexylsalicylaat	6259-76-3	2	vloeibaar	geen cat. (optionele cat. 3) ⁽³⁾ ⁽⁴⁾
Cyclamenaldehyde	103-95-7	2,3	vloeibaar	cat. 2
1-broomhexaan	111-25-1	2,7	vloeibaar	cat. 2
kaliumhydroxide (5 % water)	1310-58-3	3	vloeibaar	cat. 2
1-methyl-3-fenyl-1-piperazine	5271-27-2	3,3	vast	cat. 2
Heptanal	111-71-7	3,4	vloeibaar	cat. 2

⁽¹⁾ Deze referentiestoffen zijn een subgroep van de in het valideringsonderzoek gebruikte referentiestoffen.

⁽²⁾ In-vivoscore overeenkomstig B.4 en OESO-testrichtlijn 404 ⁽⁴⁾.

⁽³⁾ Bij deze testmethode wordt de optionele GHS-categorie 3 (licht irriterende stoffen) (1) beschouwd als geen categorie.

⁽⁴⁾ De optionele VN-GHS-categorie 3 is niet toepasbaar op grond van de CLP-verordening van de EU.

PROCEDURE

15. Het onderstaande is een beschrijving van de componenten en procedures van een RhE-methode voor beoordeling van huidirritatie. Een RhE-model moet gereconstrueerd zijn en kan in het laboratorium zelf worden ontwikkeld of in de handel worden verkregen. Standard Operating Procedures (SOP's) voor de RhE-methoden EpiSkinTM, EpiDermTM SIT (EPI-200) en SkinEthicTM zijn beschikbaar (26)(27)(28). Het testen moet op de volgende wijze worden uitgevoerd:

Componenten van de RhE-Testmethode*Algemene voorwaarden*

16. Om het epitheel op te bouwen moeten niet-getransformeerde humane keratinocyten worden gebruikt. Er moeten verschillende lagen levende epitheelcellen (basale laag, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*) aanwezig zijn onder een functioneel *stratum corneum*. Het *stratum corneum* moet uit meerdere lagen bestaan en het vereiste lipideprofiel hebben, zodat een sterke en functionele barrière wordt gevormd waar cytotoxische markerstoffen, bv. natriumdodecylsulfate (SDS) of Triton X-100, niet snel doorheen kunnen dringen. De barrierefunctie kan beoordeeld worden door de concentratie te bepalen waarin een markerstof de levensvatbaarheid van het weefsel met 50 % doet dalen (IC₅₀) na een vaste blootstellingstijd, of door de blootstellingstijd te bepalen die nodig is om de levensvatbaarheid van de cellen met 50 % te doen dalen (ET₅₀) bij aanbrenging van de markerstof in een bepaalde, vaste concentratie. De omsluitingseigenschappen van het model moeten voorkomen dat materiaal om het *stratum corneum* heen het levende weefsel kan bereiken. Dat zou een slecht model voor huidblootstelling opleveren. Het RhE-model mag niet verontreinigd zijn met bacteriën, virussen, mycoplasma of fungi.

*Functionele voorwaarden**Levensvatbaarheid*

17. De levensvatbaarheid wordt bij voorkeur gekwantificeerd door middel van de MTT-test (25). Gebruikers van het RhE-model moeten waarborgen dat iedere gebruikte batch van het RhE-model voldoet aan gedefinieerde criteria voor de negatieve controle (NC). De optische densiteit (OD) van het extractieoplosmiddel alleen moet voldoende klein zijn, d.w.z. OD < 0,1. Een aanvaardbaarheidsbereik (boven- en ondergrens) voor de OD-waarden van de negatieve controle (onder de voorwaarden van de huidirritatietestmethode) is vastgesteld door de ontwikkelaar/leverancier van het RhE-model en de aanvaardbaarheidsbereiken voor de drie gevalideerde methoden worden in tabel 2 gegeven. Er dient te worden gedocumenteerd dat de weefsels die in de negatieve controle worden gebruikt gedurende de volledige blootstellingsperiode van de test in cultuur stabiel zijn (een vergelijkbare gemeten levensvatbaarheid opleveren).

Tabel 2

Aanvaardbaarheidsbereiken voor OD-waarden in negatieve controle

	Ondergrens aanvaardbaarheid	Bovengrens aanvaardbaarheid
EpiSkin TM (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm TM SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic TM RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Barrierefunctie

18. Het *stratum corneum* met de daarin aanwezige lipiden dient sterk genoeg te zijn om snelle penetratie van cytotoxische markerstoffen, bv. SDS of Triton X-100, te weerstaan, wat wordt beoordeeld aan de hand van de IC₅₀ of ET₅₀ (tabel 3).

Morfologie

19. Histologisch onderzoek van het RhE-model moet worden uitgevoerd om aan te tonen dat de structuur van het weefsel op die van de menselijke *epidermis* lijkt (onder meer een meerlagig *stratum corneum*).

Reproduceerbaarheid

20. De resultaten van de positieve controlestof (PC) en negatieve controles (NC) van de testmethode moeten reproduceerbaar zijn in de tijd.

Kwaliteitscontrole (QC)

21. De ontwikkelaar/leverancier van het RhE-model moet garanderen en aantonen dat iedere batch van het gebruikte RhE-model voldoet aan gedefinieerde productievrijgavecriteria, waarvan die voor *levensvatbaarheid* (punt 17), *barrièrefunctie* (punt 18) en *morfologie* (punt 19) het meest relevant zijn. Deze gegevens moeten beschikbaar worden gesteld aan de gebruikers van de methode, zodat ze deze informatie kunnen opnemen in het testverslag. Een aanvaardbaarheidsbereik (boven- en ondergrens) voor de IC_{50} of de ET_{50} moet door de ontwikkelaar/leverancier van het RhE-model worden vastgesteld (of door de onderzoeker die een in eigen laboratorium ontwikkeld model gebruikt). Een betrouwbare voorspelling van irritatie-effecten kan uitsluitend worden gedaan op grond van resultaten verkregen met deugdelijk weefsel. Bij wijze van voorbeeld zijn in tabel 3 de aanvaardbaarheidsbereiken voor de drie gevalideerde methoden gegeven.

Tabel 3

Voorbeelden van QC-criteria voor batchvrijgave

	Ondergrens aanvaardbaarheid	Bovengrens aanvaardbaarheid
EpiSkin™ (SM) (SDS-behandeling van 18 uur) (26)	$IC_{50} = 1,0 \text{ mg/ml}$	$IC_{50} = 3,0 \text{ mg/ml}$
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (27)	$ET_{50} = 4,8 \text{ hr}$	$ET_{50} = 8,7 \text{ hr}$
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (28)	$ET_{50} = 4,0 \text{ hr}$	$ET_{50} = 9,0 \text{ hr}$

Het aanbrengen van de test- en controlestoffen

22. Ten minste drie weefselmonsters moeten worden gebruikt voor iedere teststof en voor de controles in ieder experiment. Voor zowel vloeibare als vaste stoffen geldt dat er zo veel teststof moet worden aangebracht dat het *epidermisoppervlak* gelijkmatig bedekt is, d.w.z. ten minste $25 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ of $25 \text{ mg}/\text{cm}^2$ moet worden gebruikt, maar er mag geen oneindige dosis worden gebruikt. In het geval van vaste stoffen moet het *epidermisoppervlak* voor aanbrenging worden bevochtigd met gedeïoniseerd of gedestilleerd water, om voor een goed contact van de teststof met het *epidermisoppervlak* te zorgen. Indien mogelijk moeten vaste stoffen in de vorm van een fijn poeder worden getest. Aan het eind van de blootstellingsperiode moet de teststof zorgvuldig met waterige buffer of 0,9 % NaCl van het *epidermisoppervlak* worden gewassen. Afhankelijk van welke van de drie gevalideerde RhE-methoden wordt gebruikt, varieert de blootstellingsperiode van 15 tot 60 minuten, en de incubatietemperatuur van 20 tot 37 °C. Deze blootstellingsperiodes en temperaturen zijn voor iedere RhE-methode geoptimaliseerd en vertegenwoordigen de verschillende intrinsieke eigenschappen van de methoden; zie voor details de Standard Operating Procedures (SOP's) voor de methoden (26)(27)(28).
23. In elk experiment moeten gelijktijdig uitgevoerde negatieve controles (NC) en positieve controles (PC) worden gebruikt om aan te tonen dat de levensvatbaarheid (met de NC), de barrièrefunctie en de resulterende gevoeligheid (met de PC) van de weefsels binnen een gedefinieerd historisch aanvaardbaarheidsbereik liggen. Als PC-stof wordt een waterige SDS-oplossing van 5 % aanbevolen. Als NC-stoffen zijn water of met fosfaat gebufferde fysiologische zoutoplossing (PBS) geschikt.

Metingen van de levensvatbaarheid van de cellen

24. Het belangrijkste aspect van de testprocedure is dat de levensvatbaarheid niet onmiddellijk na de blootstelling aan de teststoffen wordt gemeten, maar pas nadat de behandelde en gewassen weefsels voldoende lang zijn geïncubeerd in vers medium. Gedurende deze periode kan het weefsel herstellen van zwak irriterende effecten en vertonen zich duidelijke cytotoxische effecten. In de optimaliseringsfase van de test (11) (12) (13) (14) (15) is gebleken dat een na-incubatie van 42 uur optimaal is.
25. De MTT-omzettingstest is een gevalideerde kwantitatieve methode, en de aangewezen methode voor het meten van de levensvatbaarheid van de cellen binnen deze TM. De test werkt goed met geconstrueerd driedimensionaal weefsel. Het huidmonster wordt 3 uur in een MTT-oplossing met een geschikte concentratie (bv. 0,3 - 1 mg/mL) gelegd. Het neergeslagen blauwe formazanproduct wordt vervolgens met een oplosmiddel (bv. isopropanol, aangezuurde isopropanol) uit het weefsel geëxtraheerd, en de formazanconcentratie wordt bepaald door de OD te meten bij 570 nm, bij een bandbreedte van maximaal ongeveer 30 nm.
26. De optische eigenschappen van de teststof of chemische effecten van de teststof op het MTT kunnen de test storen en tot een foutieve bepaling van de levensvatbaarheid leiden (omdat de teststof de kleurproductie kan voorkomen of omkeren, of juist veroorzaken). Dit kan gebeuren als een bepaalde teststof niet volledig van de huid wordt verwijderd door wassen, of als de stof in de *epidermis* penetreert. Als de teststof rechtstreekse effecten op het MTT heeft (MTT-reductie), zelf gekleurd is, of tijdens de weefselbehandeling gekleurd raakt, moeten er aanvullende controles worden uitgevoerd om storing van de levensvatbaarheidsmeting door de teststof te detecteren en daarvoor te corrigeren. Een gedetailleerde beschrijving van hoe rechtstreekse MTT-reductie kan worden gecorrigeerd, is te vinden in de SOP's voor de drie gevalideerde testmethoden (26)(27)(28).

Aanvaardbaarheidscriteria

27. Bij elke test met deugdelijke weefselbatches (zie paragraaf 21) geeft de OD die men meet voor met NC behandelde weefsels, per definitie de kwaliteit weer van de weefsels die het hele proces van verzending en ontvangst, evenals alle stappen uit het irritatietestprotocol hebben doorgemaakt. De OD-waarden van controles mogen niet onder historisch vastgestelde ondergrenzen komen. Evenzo komt het vermogen van de weefsels om op een irriterende stof te reageren onder de specifieke omstandigheden van de TM (26)(27)(28) tot uitdrukking in metingen met weefsels die met PC, d.w.z. 5 % waterige SDS-oplossing, zijn behandeld. Er moeten bijbehorende en geschikte grenzen voor de toegestane variabiliteit tussen weefselmonsters worden gedefinieerd (bv. als standaarddeviaties worden gebruikt moeten die binnen het eenzijdige tolerantie-interval van 95 % vallen dat berekend is op grond van historische gegevens). voor de standaarddeviaties van $VRM < 18 \%$).

Interpretatie van de resultaten en voorspellingsmodel

28. De met elke teststof verkregen OD-waarden kunnen worden gebruikt voor de berekening van een levensvatbaarheid die genormaliseerd is ten opzichte van NC, die op 100 % wordt gesteld. De drempelwaarde van de procentuele levensvatbaarheid van de cellen die als scheiding tussen irriterende en niet-geclassificeerde teststoffen fungeert, en de statistische procedure(s) die worden gebruikt om de resultaten te evalueren en irriterende stoffen te identificeren, moeten duidelijk worden gespecificeerd en gedocumenteerd, en de juistheid daarvan moet worden aangetoond. De drempelwaarden voor de voorspelling van irritatie zijn hieronder gegeven:

- de teststof wordt beschouwd als irriterend voor de huid overeenkomstig VN-GHS-/EU-CLP-categorie 2, indien de levensvatbaarheid van het weefsel na blootstelling en na-incubatie minder is dan of gelijk is aan ($\leq$) 50 %;
- afhankelijk van het regelgevend kader waarin de resultaten van deze TM worden gebruikt, mag de teststof als niet irriterend voor de huid worden beschouwd overeenkomstig de VN-GHS-/EU-CLP-categorie „Geen categorie”, indien de levensvatbaarheid van het weefsel na blootstelling en na-incubatie meer is dan ($>$) 50 %.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE*Gegevens*

29. Voor elk experiment moeten gegevens van individuele weefselmonsters (bv. de OD-waarden en de berekende procentuele levensvatbaarheid van de cellen voor elke teststof, met inbegrip van de indeling) in tabelvorm worden gerapporteerd, met vermelding van gegevens uit herhaalde experimenten, indien van toepassing. Daarnaast moeten voor elk experiment gemiddelden $\pm$ standaarddeviatie worden vermeld. Waargenomen interacties met het MTT-reagens en gekleurde teststoffen moeten voor alle geteste stoffen worden gemeld.

Testverslag

30. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Test- en controlestoffen:

- de chemische naam of namen, zoals de CAS-naam en het CAS-nummer, alsmede de EG-naam en het EG-nummer, indien dit bekend is;
- de zuiverheid en de samenstelling van de stof (in gewichtsprocent(en));
- de fysisch-chemische eigenschappen die voor de uitvoering van het onderzoek relevant zijn (bv. fysische toestand, stabiliteit en vluchtigheid, pH, oplosbaarheid in water indien bekend);
- de behandeling van de test-/controlestoffen voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);
- bewaaromstandigheden.

Motivering voor het gebruikte RhE-model en protocol

Testomstandigheden:

- het gebruikte celsysteem;
- volledige ondersteunende informatie over het specifieke gebruikte huidmodel, met inbegrip van de deugdelijkheid daarvan. Hieronder moet ten minste informatie zijn over:
 - i) de levensvatbaarheid,
 - ii) de barrierefunctie,
 - iii) de morfologie,
 - iv) de reproduceerbaarheid en voorspelbaarheid,
 - v) kwaliteitscontroles (QC) van het model;
- gedetailleerde informatie over de gebruikte testprocedure;
- de gebruikte testdoses, duur van de blootstelling en de na-incubatie;
- een beschrijving van eventuele modificaties van de testprocedure;

- verwijzingen naar historische gegevens over het model. Deze moeten ten minste omvatten:
 - i) de aanvaardbaarheid van de QC-gegevens met verwijzing naar historische batchgegevens,
 - ii) de aanvaardbaarheid van de waarden voor de positieve en negatieve controles met verwijzing naar gemiddelde waarden en bereiken van negatieve en positieve controles;
- een beschrijving van de gebruikte evaluatiecriteria inclusief een motivering van de geselecteerde drempelwaarde(n) voor het voorspellingsmodel;
- verwijzingen naar historische controlegegevens;

Resultaten:

- een tabel met de gegevens voor de individuele teststoffen voor ieder experiment en iedere meting van een weefselmonster;
- indicatie van de controles die zijn gebruikt voor rechtstreeks MTT-reducerende stoffen en/of gekleurde teststoffen;
- beschrijving van andere waargenomen effecten.

Bespreking van de resultaten

Conclusie

LITERATUUR

- (1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, UN New York and Geneva. Available at: [[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs_rev03/03files_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/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. Available at: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (3) Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 december 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. OJ L 353, 31.12.2008, p. 1.
- (4) OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris. Available at: [<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. Available at: [<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. Available at: [<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. Available at: [<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)? Available at: [<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. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001), A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, Results and evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.
- (11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765-770.
- (12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004), Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests, *ALTEX* 21, 107-114.
- (13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests - An assessment of the performance of the optimised test, *ATLA* 33, 351-367.

- (14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinstein, G. (2005), The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, ATLA 33, 329-349.
- (15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002), Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, ATLA 30, 109-129.
- (16) Spielmann, H., mailto:Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., mailto:Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test, ATLA 35, 559-601.
- (17) Hoffmann, S. (2006), ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1- α . Available at: [<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-Tessonneaud, 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. Available at: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Available at: [<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. Available at: [<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. Available at: [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) EpiSkinTM SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkinTM test method 15 min - 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Available at: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (27) EpiDermTM SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: *In vitro* EpiDermTM skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Available at: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (28) SkinEthicTM RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42 bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Available at: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (29) Harvell, J.D., Lamminstusta, K., and Maibach, H.I. (1995), Irritant contact dermatitis, In: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.
- (30) Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 adapting to technical progress for the 28th time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances, OJ L 225, 21.8.2001, p. 1.
- (31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. and Robinson, M.K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. Contact Dermatitis 51, 1-4.

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

Aanhangsel 1

Definities

Nauwkeurigheid: de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de testmethode en erkende referentiewaarden. Het is een maat voor de prestaties van de testmethode en één aspect van relevantie. Deze term en de term „concordantie”, waaronder het percentage correcte uitkomsten van een testmethode wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt (9).

Levensvatbaarheid van cellen: een parameter waarmee de totale activiteit van een celpopulatie wordt gemeten, bv. het vermogen van cellulaire mitochondriale dehydrogenases om de vitale kleurstof MTT (3-(4,5-dimethylthiazool-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromide, thiazolylblauw) te reduceren, dat, afhankelijk van het gemeten eindpunt en de opzet van de test, is gecorreleerd met het totale aantal levende cellen en/of de vitaliteit van de cellen.

Concordantie: dit is een maat voor de prestaties van de testmethode voor testmethoden die een categoriale uitkomst geven en het is één aspect van relevantie. Deze term en de term „nauwkeurigheid” worden vaak door elkaar gebruikt; de term wordt gedefinieerd als het percentage van alle geteste chemische stoffen die correct als positief of negatief worden geclassificeerd (9).

ET₅₀: kan worden geraamd door vaststelling van de blootstellingstijd die nodig is om de levensvatbaarheid van de cellen met 50 % te doen dalen bij aanbrenging van de markerstof in een bepaalde, vaste concentratie. Zie ook IC₅₀.

EU CLP (Verordening (EG) nr. 1272/2008 van het Europees Parlement en de Raad van 16 december 2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels): voert in de Europese Unie (EU) het GHS-systeem van de VN uit dat chemicaliën (stoffen en mengsels) indeelt en etiketteert (3).

GHS (mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen van de Verenigde Naties (VN)): een systeem voor de indeling van chemische producten (stoffen en mengsels) op basis van gestandaardiseerde soorten en niveaus van gevaren van fysische aard en gevaren voor de gezondheid en het milieu, en dat de desbetreffende voorlichtingselementen bepaalt, zoals pictogrammen, signaalwoorden, gevarenaanduidingen, voorzorgsmaatregelen en veiligheidsinformatiebladen, waarmee informatie over de schadelijke effecten van de stoffen kenbaar wordt gemaakt teneinde mensen (waaronder werkgevers, werknemers, transporteurs, consumenten en spoedhulpverleners) en het milieu te beschermen (1).

IC₅₀: kan worden geraamd door vaststelling van de concentratie waarin een markerstof de levensvatbaarheid van de weefsels met 50 % doet dalen (IC₅₀) na een vaste blootstellingstijd. Zie ook ET₅₀.

Oneindige dosis: hoeveelheid op de *epidermis* aangebrachte teststof die groter is dan de hoeveelheid die nodig is om het *epidermisoppervlak* volledig en gelijkmatig te bedekken.

„Me too”-test: een informele uitdrukking voor een testmethode die in structureel en functioneel opzicht vergelijkbaar is met een gevalideerde en geaccepteerde testmethode. Een dergelijke testmethode zou geschikt zijn voor inhaalvalidering. Dit is een alternatieve benaming voor gelijksoortige testmethode (9).

Prestatienormen: Normen, gebaseerd op een gevalideerde referentiemethode, die de basis vormen voor de beoordeling van de vergelijkbaarheid van een voorgestelde, in mechanistisch en functioneel opzicht gelijksoortige testmethode. Hieronder begrepen zijn: i) essentiële componenten van de testmethode; ii) een minimumlijst van referentiestoffen die zijn gekozen uit de stoffen die zijn gebruikt om de aanvaardbare prestaties van de gevalideerde testmethode aan te tonen; en iii) de nauwkeurigheids- en betrouwbaarheidsniveaus die door de voorgestelde testmethode moeten worden gehaald wanneer ze worden beoordeeld aan de hand van de minimumlijst van referentiestoffen; deze waarden zijn gebaseerd op de waarden die voor de gevalideerde testmethode zijn verkregen (9).

Referentiestoffen: chemische stoffen die gebruikt worden in het valideringsproces, waarvan de responsen in het *in-vitro*-of *in-vivo*referentietestsysteem of de doelsoort reeds bekend zijn. Deze chemische stoffen moeten representatief zijn voor de klassen van chemische stoffen waarvoor de testmethode zal worden gebruikt en moeten het volledige bereik van responsen bestrijken dat verwacht kan worden van de chemische stoffen waarvoor de test gebruikt zal worden, van sterk tot zwak, tot negatief. Het kan nodig zijn om verschillende reeksen referentiestoffen te gebruiken voor de verschillende fasen van het valideringsproces en voor verschillende testmethoden en -doeleinden (9).

Relevantie: beschrijving van het verband van de test met het te onderzoeken effect en of de test betekenis heeft en nuttig is voor een bepaald doel. Het is de mate waarin de test het te onderzoeken biologische effect correct meet of voorspelt. Relevantie omvat een beoordeling van de nauwkeurigheid (concordantie) van een testmethode (9).

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een testmethode, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden toegepast. De betrouwbaarheid wordt beoordeeld door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid (9).

Vervangende test: een test, ontworpen ter vervanging van een voor de identificatie van gevaren en/of risicobeoordeling geaccepteerde en routinematig gebruikte test, waarvan is vastgesteld dat hij, in vergelijking met de geaccepteerde test, de gezondheid van mens of dier of het milieu, naargelang het geval, gelijke of betere bescherming biedt voor alle mogelijke testsituaties en chemische stoffen (9).

Gevoeligheid: het percentage van alle positieve/actieve teststoffen dat door de test correct wordt ingedeeld. De gevoeligheid is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert en is een belangrijke factor voor de beoordeling van de relevantie van een testmethode (9).

Huidirritatie: het ontstaan van reversibele weefselschade aan de huid na het aanbrengen van een testmateriaal gedurende maximaal vier uur. Huidirritatie is een lokaal optredende, niet-immunogene reactie die zich kort na stimulatie voordoet (29). Het voornaamste kenmerk is dat het een reversibel proces is waarbij inflammatoire reacties en de meeste klinische symptomen van ontstekinggerelateerde irritatie (erytheem, oedeem, jeuk en pijn) optreden.

Specificiteit: het percentage van alle negatieve/inactieve teststoffen dat door de test correct wordt ingedeeld. De specificiteit is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert, en is een belangrijke factor bij de beoordeling van de relevantie van een testmethode (9).

Trapsgewijze teststrategie: teststrategie waarbij opeenvolgende testmethoden worden gebruikt; de in elke volgende stap geselecteerde testmethoden worden gekozen op basis van de resultaten van de vorige teststap (9).

Teststof: iedere stof of ieder mengsel die/dat met deze TM wordt getest.

Aanhangsel 2

Prestatienormen voor beoordeling van voorgestelde soortgelijke of gewijzigde *in vitro* testmethoden met gereconstrueerde humane epidermis (RhE) voor de bepaling van huidirritatie

INLEIDING

1. Prestatienormen zijn bedoeld om mee te delen op welke grondslag kan worden vastgesteld dat nieuwe testmethoden, zowel niet-generieke methoden (d.w.z. methoden die beschermd zijn door het auteursrecht, die een handelsmerk hebben en die geregistreerd zijn) als generieke methoden, bepaald kunnen worden teneinde voldoende nauwkeurigheid en betrouwbaarheid te bieden voor specifieke testdoeleinden. Deze prestatienormen, die gebaseerd zijn op gevalideerde en geaccepteerde testmethoden, kunnen worden gebruikt om de betrouwbaarheid en nauwkeurigheid te beoordelen van andere soortgelijke methoden (informeel „me too“-tests genoemd) die gebaseerd zijn op soortgelijke wetenschappelijke principes en die hetzelfde biologische of toxische effect meten of voorspellen (9).
2. Voordat gewijzigde methoden (d.w.z. voorgestelde potentiële verbeteringen van een goedgekeurde testmethode) gebruikt kunnen worden, moet een evaluatie worden uitgevoerd ter bepaling van het effect van de voorgestelde wijzigingen op de prestaties van de test en de mate waarin dergelijke wijzigingen de informatie beïnvloeden die beschikbaar is voor de andere componenten van het valideringsproces. Afhankelijk van de aard van de voorgestelde wijzigingen en hun aantal, de gegenereerde gegevens en ondersteunende documentatie voor deze wijzigingen, moeten ze onderworpen worden aan hetzelfde valideringsproces als het voor een nieuwe test beschreven proces of, indien van toepassing, aan een beperkte beoordeling van betrouwbaarheid en relevantie met gebruikmaking van geaccepteerde prestatienormen (9).
3. Soortgelijke („me too“) of gewijzigde methoden van elk van de drie gevalideerde methoden (EpiSkin™ (aangeduid als de Validated Reference Method (VRM), gevalideerde referentiemethode), EpiDerm™ SIT (EPI-200) en SkinEthic™ RHE) die zijn voorgesteld voor gebruik in het kader van deze testmethode, moeten worden beoordeeld om hun betrouwbaarheid en nauwkeurigheid na te gaan met behulp van chemische stoffen die het volledige bereik van Draize-irritatiescores bestrijken. Wanneer de voorgestelde soortgelijke of gewijzigde methoden zijn beoordeeld aan de hand van de 20 aanbevolen referentiestoffen van de prestatienormen (tabel 1), moeten ze betrouwbaarheids- en nauwkeurigheidswaarden opleveren die vergelijkbaar zijn met of beter zijn dan die van de VRM (tabel 2) (2) (16). De te behalen betrouwbaarheids- en nauwkeurigheidswaarden worden vermeld in de punten 8 tot 12 van dit aanhangsel. De groep referentiestoffen omvat niet-geclassificeerde (VN GHS/EU CLP geen categorie) en geclassificeerde (VN GHS/EU CLP categorie 2) (1) stoffen, die verschillende chemische klassen vertegenwoordigen, zodat de betrouwbaarheid en nauwkeurigheid (gevoeligheid, specificiteit en algemene nauwkeurigheid) van de voorgestelde testmethode vergeleken kunnen worden met die van de VRM. Zowel de betrouwbaarheid van de methode als het vermogen om irriterende stoffen van VN GHS/EU CLP categorie 2 correct te identificeren en, afhankelijk van het regelgevingskader waarvoor gegevens worden geproduceerd, ook het vermogen om stoffen van VN GHS/EU CLP geen categorie correct te identificeren, moeten worden bepaald voordat de methode kan worden gebruikt voor het testen van nieuwe stoffen.

4. Deze prestatienormen zijn gebaseerd op de prestatienormen van het EC-CEVMA (8), bijgewerkt volgens de VN-GHS- en EU-CLP-systemen betreffende indeling en etikettering (1) (3). De oorspronkelijke prestatienormen werden vastgesteld na voltooiing van het valideringsonderzoek (21) en werden gebaseerd op het classificatiesysteem van de EU als bepaald in Richtlijn 2001/59/EG van de Commissie van 6 augustus 2001 tot achtentwintigste aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van Richtlijn 67/548/EEG van de Raad betreffende de aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen inzake de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke stoffen (¹). Omwille van de aannahme van het VN-GHS-systeem voor indeling en etikettering in de EU (EU CLP) (3), die plaatsvond tussen de voltooiing van het valideringsonderzoek en de voltooiing van deze TM, werden de prestatienormen bijgewerkt (8). Deze bijwerking betrof voornamelijk wijzigingen (i) in de reeks referentiestoffen voor de prestatienormen, en (ii) aan de vastgestelde betrouwbaarheids- en nauwkeurigheidswaarden (2) (23).

PRESTATIENORMEN VOOR IN-VITRO-RhE-TESTMETHODEN VOOR HUIDIRRITATIE

5. De prestatienormen omvatten de volgende drie elementen (9):

- I) essentiële componenten van de testmethode;
- II) minimumlijst van referentiestoffen;
- III) vastgestelde betrouwbaarheids- en nauwkeurigheidswaarden.

I) Essentiële componenten van de testmethode

6. Deze bestaan uit essentiële structurele, functionele en procedurele componenten van een gevalideerde methode die moeten worden opgenomen in het protocol van een voorgestelde, in mechanistisch en functioneel opzicht soortgelijke of gewijzigde methode. Deze componenten omvatten unieke kenmerken van de methode, cruciale procedurele gegevens en metingen in het kader van de kwaliteitscontrole. Het vasthouden aan essentiële componenten van de testmethode zorgt ervoor dat een soortgelijke of gewijzigde voorgestelde methode uitgaat van dezelfde begrippen als de bijbehorende VRM (9). De essentiële componenten van de testmethode worden uitvoerig beschreven in de punten 16 tot 21 van de TM en het testen moet als volgt plaatsvinden:

- De algemene voorwaarden (punt 16)
- De functionele voorwaarden, namelijk:
 - levensvatbaarheid (punt 17);
 - barrièrefunctie (punt 18);
 - morfologie (punt 19);
 - reproduceerbaarheid (punt 20); en
 - kwaliteitscontrole (punt 21).

II) Minimumlijst van referentiestoffen

7. Referentiestoffen worden gebruikt om na te gaan of de betrouwbaarheid en nauwkeurigheid van een voorgestelde soortgelijke of gewijzigde methode, waarvan is aangetoond dat deze in structureel en functioneel opzicht voldoende gelijk is op de VRM, of die een kleine wijziging aan een van de drie gevalideerde methoden aanbrengt, vergelijkbaar zijn als of beter zijn dan de betrouwbaarheid en nauwkeurigheid van de VRM (2) (8) (16) (23). De 20 aanbevolen referentiestoffen die in tabel 1 worden opgesomd, omvatten stoffen uit verschillende chemische klassen (d.w.z. chemische categorieën op basis van functionele groepen), die het volledige bereik van Draize-irritatiescores bestrijken (van niet-irriterend tot sterk irriterend). De in deze lijst opgenomen stoffen omvatten 10 stoffen ingedeeld bij VN GHS/EU-CLP categorie 2 en 10 niet in een categorie ingedeelde stoffen, waarvan er drie optioneel worden ingedeeld bij VN GHS categorie 3. In het kader van deze testmethode wordt de optionele categorie 3 beschouwd als „geen categorie”. De in tabel 1 opgenomen stoffen zijn geselecteerd uit de stoffen die worden gebruikt tijdens de optimalisatiefase die volgde op de prevalidering en in het valideringsonderzoek van de VRM, met betrekking tot hun chemische functionaliteit en fysische toestand (14) (18). Deze referentiestoffen vormen het minimumaantal stoffen dat gebruikt moet worden voor de evaluatie van de nauwkeurigheid en betrouwbaarheid van een voorgestelde soortgelijke of gewijzigde methode, maar mogen niet worden gebruikt voor de ontwikkeling van nieuwe methoden. Wanneer een stof uit de lijst niet beschikbaar is, kan een andere stof waarvoor voldoende in-vivoreferentiegegevens beschikbaar zijn, worden gebruikt, voornamelijk een van de stoffen die zijn gebruikt in de optimaliseringsfase na de prevalidering of het valideringsonderzoek van de VRM. Indien gewenst, kan de minimumlijst van referentiestoffen worden uitgebreid met stoffen die andere chemische klassen vertegenwoordigen en waarvoor voldoende in-vivoreferentiegegevens beschikbaar zijn, om de nauwkeurigheid van de voorgestelde methode nader te evalueren.

(¹) PB L 225 van 21.8.2001, blz. 1

Tabel 1

Minimumlijst van referentiestoffen voor de bepaling van de nauwkeurigheds- en betrouwbaarheidswaarden van soortgelijke of gewijzigde huidirritatiemethoden met gereconstrueerde humane epidermis (RHE) ⁽¹⁾

Chemische stof	CAS-nummer	Fysische toestand	In-vivo-score	VRM in vitro cat.	VN GHS/EU CLP in vivo cat.
1-broom-4-chloorbutaan	6940-78-9	vloeibaar	0	cat. 2	geen cat.
diethylftalaat	84-66-2	vloeibaar	0	geen cat.	geen cat.
naftaleenazijnzuur	86-87-3	vast	0	geen cat.	geen cat.
allylfenoxyacetaat	7493-74-5	vloeibaar	0,3	geen cat.	geen cat.
isopropanol	67-63-0	vloeibaar	0,3	geen cat.	geen cat.
4-methylthiobenzaldehyde	3446-89-7	vloeibaar	1	cat. 2	geen cat.
methylstearaat	112-61-8	vast	1	geen cat.	geen cat.
heptylbutyraat	5870-93-9	vloeibaar	1,7	geen cat.	geen cat.
hexylsalicylaat	6259-76-3	vloeibaar	2	geen cat.	geen cat.
cinnamaldehyde	104-55-2	vloeibaar	2	cat. 2	geen cat. (optionele cat. 3) ⁽³⁾
1-decanol (⁽²⁾)	112-30-1	vloeibaar	2,3	cat. 2	cat. 2
cyclamenaldehyde	103-95-7	vloeibaar	2,3	cat. 2	cat. 2
1-broomhexaan	111-25-1	vloeibaar	2,7	cat. 2	cat. 2
2-chloormethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypyridine HCl	86604-75-3	vast	2,7	cat. 2	cat. 2
di-n-propyldisulfide (⁽²⁾)	629-19-6	vloeibaar	3	geen cat.	cat. 2
kaliumhydroxide (5 % water)	1310-58-3	vloeibaar	3	cat. 2	cat. 2
benzeenethiol, 5-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl	7340-90-1	vloeibaar	3,3	cat. 2	cat. 2
1-methyl-3-fenyl-1-piperazine	5271-27-2	vast	3,3	cat. 2	cat. 2
heptanal	111-71-7	vloeibaar	3,4	cat. 2	cat. 2
tetrachloorethyleen	127-18-4	vloeibaar	4	cat. 2	cat. 2

⁽¹⁾ De chemische stoffen zijn gekozen aan de hand van de volgende criteria: i) de stoffen zijn verkrijgbaar in de handel; ii) ze bestrijken het volledige bereik van Draize-irritatiescores (van niet-irriterend tot sterk irriterend); iii) de chemische structuur van de stoffen is goed omschreven; iv) ze zijn representatief voor de chemische functionaliteit die in het valideringsproces is gebruikt; en v) ze kennen geen extreem toxisch profiel (bv. carcinogeen of toxisch voor het voortplantingssysteem) en er zijn ook geen buitensporige verwijderingskosten aan verbonden.

⁽²⁾ Stoffen die irriterend zijn voor konijnen, maar waarvoor betrouwbaar bewijs is dat ze niet-irriterend zijn voor mensen (31) (32) (33).

⁽³⁾ Volgens de VN GHS, niet in de EU CLP ()

III) Vastgestelde betrouwbaarheids- en nauwkeurigheidswaarden

8. Teneinde de betrouwbaarheid en relevantie vast te stellen van voorgestelde soortgelijke of gewijzigde methoden die tussen laboratoria worden overgedragen, moeten de 20 referentiestoffen uit tabel 1 in ten minste drie laboratoria worden getest. Indien de voorgestelde methode echter in slechts één laboratorium zal worden gebruikt, is het niet nodig om de methode te valideren aan de hand van tests in verschillende laboratoria. Het is echter van essentieel belang dat dergelijke valideringsonderzoeken onafhankelijk worden beoordeeld door internationaal erkende valideringsinstanties, in overeenstemming met internationale richtsnoeren (9). In elk laboratorium dienen alle 20 referentiestoffen te worden getest in drie onafhankelijke experimenten met verschillende weefselbatches en op tijdstippen die voldoende ver uit elkaar liggen. Elk experiment moet bestaan uit minstens drie gelijktijdig geteste weefselmonsters voor elke opgenomen teststof, negatieve controle (NC) en positieve controle (PC).

9. De betrouwbaarheids- en nauwkeurigheidswaarden van de voorgestelde methode moeten worden berekend met inachtneming van alle vier de onderstaande criteria, waardoor de betrouwbaarheids- en relevantiewaarden op een vooraf gedefinieerde en consistente manier worden berekend:

1. Alleen de gegevens van experimenten van volledige reeksen komen in aanmerking voor de berekening van de methode voor variabiliteit en voorspellingskracht (nauwkeurigheid) binnen een laboratorium en tussen laboratoria.
2. In elk deelnemend laboratorium moet de uiteindelijke classificatie van elke referentiestof plaatsvinden op basis van de gemiddelde levensvatbaarheid over de verschillende experimenten van een volledige reeks.
3. Alleen de gegevens verkregen voor stoffen met volledige reeksen experimenten in alle deelnemende laboratoria komen in aanmerking voor de berekening van de methode voor variabiliteit tussen laboratoria.
4. De nauwkeurigheidswaarden moeten worden berekend op basis van de afzonderlijke laboratoriumvoorspellingen die de verschillende deelnemende laboratoria hebben verkregen voor de 20 referentiestoffen.

In dit verband bestaat een **reeks experimenten** uit drie afzonderlijke experimenten van één laboratorium voor één teststof. Een **volledige reeks experimenten** is een reeks experimenten van één laboratorium voor één teststof waarbij de drie experimenten allemaal geldig zijn. Dit betekent dat één ongeldig experiment een volledige reeks van drie experimenten ongeldig maakt.

Intralaboratoriumreproduceerbaarheid

10. Een beoordeling van intralaboratoriumreproduceerbaarheid zou een concordantie van ten minste ($\geq$) 90 % moeten vertonen tussen de classificaties van de 20 referentiestoffen (VN GHS/EU CLP categorie 2 en geen categorie) die in verschillende, onafhankelijke experimenten binnen één laboratorium tot stand zijn gekomen.

Interlaboratoriumreproduceerbaarheid

11. Het is niet nodig de interlaboratoriumreproduceerbaarheid te beoordelen als de voorgestelde methode in slechts één laboratorium zal worden gebruikt; Voor methoden die tussen laboratoria moeten worden overgedragen, moet de concordantie van classificaties van de 20 referentiestoffen (VN GHS/EU CLP categorie 2 en geen categorie) die tot stand zijn gekomen in verschillende, onafhankelijke experimenten in bij voorkeur minimaal drie laboratoria, ten minste ($\geq$) 80 % zijn.

Voorspellingskracht (nauwkeurigheid)

12. De nauwkeurigheid (gevoeligheid, specificiteit en algemene nauwkeurigheid) van de voorgestelde soortgelijke of gewijzigde methode moet vergelijkbaar zijn met of beter zijn dan die van de VRM, rekening houdend met aanvullende informatie betreffende de relevantie in de onderzochte soort (tabel 2). De gevoeligheid moet ten minste ($\geq$) 80 % zijn (2) (8) (23). Een bijkomende specifieke beperking geldt echter voor de gevoeligheid van de voorgestelde in-vitromethode, omdat slechts twee in-vivostoffen van categorie 2, *1-decanol* en *di-n-propyldisulfide* door meer dan één deelnemend laboratorium verkeerdelijk ingedeeld kunnen worden als „geen categorie”. De specificiteit moet ten minste ($\geq$) 70 % zijn (2) (8) (23). Er zijn geen verdere beperkingen met betrekking tot de specificiteit van de voorgestelde in-vitromethode, d.w.z. een deelnemend laboratorium kan eender welke in-vivostof die tot geen categorie behoort, verkeerdelijk indelen zolang de uiteindelijke specificiteit van de testmethode binnen het aanvaardbare bereik blijft. De algemene nauwkeurigheid moet ten minste ($\geq$) 75 % zijn (2) (8) (23). Hoewel de gevoeligheid van de VRM die is berekend voor de 20 referentiestoffen in tabel 1 gelijk is aan 90 %, wordt de vastgestelde minimale gevoeligheidswaarde die vereist is voor een soortgelijke of gewijzigde methode vastgesteld op 80 % opdat deze geldig zou worden beschouwd, aangezien zowel *1-decanol* (een grensgeval) en *di-n-propyldisulfide* (een valsnegatief van de VRM) erom bekend staan dat zij niet-irriterend zijn voor mensen (31) (32) (33), hoewel ze in de proef met konijnen als irriterende stoffen zijn aangemerkt. Aangezien RhE-modellen uitgaan van cellen van humane oorsprong, kunnen ze voorspellen dat deze stoffen niet-irriterend zijn (VN GHS/EU CLP geen categorie).

Tabel 2

Voorspellingswaarden voor gevoeligheid, specificiteit en algemene nauwkeurigheid die vereist zijn opdat soortgelijke of gewijzigde methoden geldig worden geacht.

Gevoeligheid	Specificiteit	Algemene nauwkeurigheid
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Acceptatiecriteria van het onderzoek

13. Het is mogelijk dat een of meer tests betreffende een of meer teststoffen niet voldoen aan de acceptatiecriteria van de test- en controlestoffen of dat zij om andere redenen niet aanvaardbaar zijn. Voor elke teststof mogen ten hoogste twee aanvullende tests worden verricht om ontbrekende gegevens aan te vullen („hertesten”). Omdat bij hertesten ook PC en NC gelijktijdig moeten worden getest, mogen met name voor elke teststof ten hoogste twee aanvullende experimenten worden verricht.
14. Het is denkbaar dat het minimumaantal van drie geldige experimenten voor elke geteste stof zelfs na hertesten niet wordt bereikt voor elke referentiestof in elk deelnemend laboratorium, wat leidt tot een onvolledige gegevensmatrix. In zulke gevallen worden de gegevensreeksen uitsluitend aanvaardbaar geacht als aan de volgende drie criteria is voldaan:
 1. Op alle 20 referentiestoffen moet ten minste één volledige reeks experimenten zijn verricht.
 2. In elk van de ten minste drie deelnemende laboratoria moet ten minste 85 % van de reeksen experimenten volledig zijn (voor 20 stoffen; d.w.z. in één laboratorium zijn 3 ongeldige reeksen experimenten toegestaan).
 3. Ten minste 90 % van alle mogelijke reeksen experimenten van ten minste drie laboratoria moet volledig zijn (voor 20 stoffen getest in 3 laboratoria; d.w.z. in totaal zijn 6 ongeldige reeksen experimenten toegestaan)."
- 3) De volgende hoofdstukken worden toegevoegd:

„B.49. IN-VITROMICRONUCLEUSTEST BIJ ZOOGDIERCELLEN

INLEIDING

1. De in-vitromicronucleusbepaling (MNvit) is een genotoxiciteitstest waarmee micronuclei (MN) in het cytoplasma van interfasecellen worden opgespoord. Micronuclei kunnen ontstaan uit acentrische chromosoomfragmenten (d.w.z. zonder centromeer) of volledige chromosomen die tijdens het anafasestadium van de celdeling niet naar de polen kunnen migreren. De bepaling spoorde de activiteit van clastogene en aneugene chemische stoffen (stoffen en mengsels) (1) (2) op in cellen die tijdens of na blootstelling aan de teststof celdeling hebben ondergaan. Bij deze testmethode (TM) mogen protocollen met en zonder de actinopolymerisatiemmer cytochalasine B (cytoB) worden gebruikt. De toevoeging van cytoB alvorens de beoogde mitose plaatsvindt, maakt identificatie en selectieve analyse mogelijk van de micronucleusfrequentie in cellen die één mitose hebben voltooid, omdat dergelijke cellen binucleair zijn (3) (4). Met deze TM is het ook mogelijk protocollen zonder cytokineseblokking te gebruiken op voorwaarde dat er bewijzen zijn dat de geanalyseerde celpopulatie mitose heeft ondergaan.
2. De MNvit-bepaling kan niet alleen worden gebruikt om chemische stoffen (stoffen en mengsels) te identificeren die micronuclei induceren, maar het gebruik van een cytokineseblokking, de immunochemische labeling van kinetochoren of hybridisatie met centromere/telomere proben (fluorescentie *in situ* hybridisatie (FISH)) kan ook informatie verstrekken over de mechanismen van chromosoombeschadiging en de vorming van micronuclei (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). De labeling- en hybridisatieprocedures kunnen worden gebruikt wanneer sprake is van een toename van micronucleivorming en de onderzoeker wenst te bepalen of die toename het gevolg is van clastogene en/of aneugene gebeurtenissen.
3. Micronuclei vertonen schade die is doorgegeven aan dochtercellen, terwijl in metafasecellen gescoorde chromosoomafwijkingen mogelijk niet doorgegeven worden. Omdat micronuclei in interfasecellen op relatief objectieve wijze kunnen worden beoordeeld, hoeft het laboratoriumpersoneel alleen na te gaan of de cellen al dan niet deling hebben ondergaan en hoeveel cellen een micronucleus bevatten. Bijgevolg kunnen de preparaten vrij snel worden gescoord en kan de analyse worden geautomatiseerd. Zo wordt het in de praktijk mogelijk om niet honderden, maar duizenden cellen per behandeling te scoren, hetgeen de bepaling krachtiger maakt. Aangezien micronuclei kunnen ontstaan uit achtergebleven chromosomen, is het tot slot mogelijk om stoffen op te sporen die aneuploidie induceren en die moeilijk onderzocht kunnen worden in conventionele tests op chromosoomafwijkingen, bv. OESO-testrichtlijn 473 (hoofdstuk B.10 van deze bijlage) (17). Aan de hand van de MNvit-bepaling is het zonder bijzondere technieken, zoals de in punt 2 beschreven FISH, echter niet mogelijk te differentiëren tussen stoffen die polyploidie induceren en stoffen die clastogeniciteit induceren.

4. De MNvit-bepaling is een in-vitromethode waarvoor meestal gekweekte menselijke cellen of cellen van knaagdieren worden gebruikt. Zij biedt een brede basis voor onderzoek van mogelijke in-vitrobeschadiging van chromosomen, omdat zowel aneugenen als clastogenen kunnen worden opgespoord.
5. De MNvit-bepaling is robuust en effectief in verschillende celtypen en in de aanwezigheid of afwezigheid van cytoB. Er zijn uitgebreide gegevens die de validiteit van de MNvit-bepaling met behulp van diverse cellijnen van knaagdieren (CHO, V79, CHL/IU en L5178Y) en humane lymfocyten ondersteunen (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Hieronder zijn met name begrepen de internationale valideringsonderzoeken die zijn gecoördineerd door de Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22) en de verslagen van de International Workshop on Genotoxicity Testing (4) (16). De beschikbare gegevens zijn ook opnieuw beoordeeld tijdens een retrospectief valideringsonderzoek naar het gewicht van de evidentie door het Europees Centrum voor de validering van alternatieve methoden (ECVAM) van de Europese Commissie, en de testmethode is door het Raadgevend wetenschappelijk comité van het ECVAM bekrachtigd als wetenschappelijk geldig (32) (33) (34). Het gebruik van de humane TK6 lymfoblastoïde cellijn (35), HepG2-cellen (36) (37) en primaire embryocellen van de Syrische hamster (38) is beschreven, hoewel ze niet zijn gebruikt in valideringsonderzoeken.

DEFINITIES

6. Gebruikte definities worden gegeven in aanhangsel 1.

TOELICHTING

7. Bij in vitro uitgevoerde tests moet er meestal een exogene metabole activeringsbron worden gebruikt, tenzij de cellen qua metabolisme competent zijn met betrekking tot de geteste stoffen. Het exogene metabole activerings-systeem kan de omstandigheden in vivo niet volledig nabootsen. Er moet ook goed op worden gelet dat omstandigheden die kunnen leiden tot artefactuele positieve resultaten die niet het gevolg zijn van intrinsieke mutageniteit maar die worden veroorzaakt door veranderingen in factoren zoals opvallende wijzigingen in de pH of de osmolaliteit of door een sterke cytotoxiciteit, worden vermeden (39) (40) (41). Indien de teststof op het ogenblik van toevoeging een wijziging in de pH van het medium veroorzaakt, moet de pH worden aangepast, bij voorkeur door de stamplossing te bufferen zodat alle volumes van alle testconcentraties, en voor alle controles, dezelfde blijven.
8. Om de inductie van micronuclei te analyseren, is het van essentieel belang dat zowel in de behandelde als de onbehandelde culturen mitose heeft plaatsgevonden. Het meest informatieve stadium voor het scoren van micronuclei is in cellen die één mitose voltooid hebben tijdens of na de behandeling met de teststof.

PRINCIPE VAN DE TEST

9. Culturen van humane cellen of zoogdiercellen worden blootgesteld aan de teststof met en zonder een exogene metabole activeringsbron tenzij cellen met een toereikende metaboliseringscapaciteit worden gebruikt. In elke test worden gelijktijdig controles met oplosmiddel/medium (VC) en positieve controles (PC) uitgevoerd.
10. Tijdens of na blootstelling aan de teststof worden de cellen gekweekt tijdens een periode die lang genoeg is om ervoor te zorgen dat chromosoom- of spoeldraadbeschadiging leidt tot de vorming van micronuclei in interfasecellen. Voor de inductie van aneuploidie moet de teststof gewoon aanwezig zijn tijdens mitose. Geoogste en gekleurde interfasecellen worden onderzocht op de aanwezigheid van micronuclei. Idealiter mogen micronuclei alleen worden gescoord in de cellen die de mitose hebben voltooid tijdens blootstelling aan de teststof of tijdens de periode na de blootstelling, als een dergelijke periode wordt toegepast. In culturen die behandeld zijn met een cytokineseblokkeerder wordt dit bereikt door uitsluitend binucleaire cellen te scoren. Wanneer geen cytokineseblokkeerder wordt gebruikt, is het belangrijk aan te tonen dat de onderzochte cellen wellicht celdeling hebben ondergaan tijdens of na de blootstelling aan de teststof. Het is belangrijk dat alle protocollen aantonen dat celproliferatie zich zowel in de controleculturen als de behandelde culturen heeft voorgedaan, en de mate van door de teststof geïnduceerde cytotoxiciteit of cytostase moet worden beoordeeld in de culturen of (in parallelle culturen) die voor micronuclei gescoord zijn.

BESCHRIJVING VAN DE BEPALING

Preparaten

11. Primaire culturen van humane lymfocyten uit perifeer bloed (5) (19) (42) (43) en een aantal knaagdiercellijnen zoals CHO, V79, CHL/IU, en L5178Y mogen worden gebruikt (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Het gebruik van andere cellijnen en celtypen moet worden verantwoord op basis van hun aangetoonde prestaties in de bepaling, zoals beschreven in het hoofdstuk over aanvaardbaarheidscriteria. Omdat de achtergrondfrequentie van micronuclei van invloed zal zijn op de gevoeligheid van de bepaling, wordt aanbevolen dat celtypen met een lage, stabiele achtergrondfrequentie van micronucleusvorming worden gebruikt.

12. Humane lymfocyten uit perifeer bloed dienen te worden verkregen van gezonde, jonge mensen (ongeveer 18-35 jaar oud), niet-rokers die voor zover bekend onlangs niet zijn blootgesteld aan genotoxische stoffen of straling. Indien cellen van meer dan één donor voor gebruik worden gepoold, moet het aantal donors aangegeven worden. De micronucleusfrequentie neemt met de leeftijd toe en deze tendens is meer uitgesproken bij vrouwen dan bij mannen (44). Dit moet in aanmerking worden genomen bij de selectie van te poolen donorcellen.

Media en cultuuroomstandigheden

13. Er moet worden gezorgd voor geschikte kweekmedia en incubatieomstandigheden (kweekvat, CO₂-concentratie, temperatuur en vochtigheid) voor de culturen. Permanente cellijnen en stammen moeten geregeld worden gecontroleerd om na te gaan of het modale aantal chromosomen stabiel is en er geen besmetting met mycoplasma heeft plaatsgevonden; indien er wel een besmetting heeft plaatsgevonden of indien het modale aantal chromosomen gewijzigd is, mogen ze niet worden gebruikt. De normale tijd voor de celcyclus bij de in het testlaboratorium gebruikte kweekomstandigheden moet bekend zijn. Indien de methode met cytokineseblokker wordt toegepast, moet de concentratie van de cytokineseremmer worden geoptimaliseerd voor het welbepaalde celtype en moet deze aantoonbaar een goede opbrengst opleveren van binucleaire cellen die vervolgens kunnen worden gescoord.

Prepareren van de culturen

14. Permanente cellijnen en stammen: cellen uit stamculturen worden met een zodanige dichtheid in een kweekmedium geënt dat de kolonies niet aaneengroeien in een monolaagcultuur en dat de suspensieculturen voor het oogsten geen overmatige dichtheid bereiken, en bij 37 °C geïncubeerd.
15. Lymfocyten: met een stollingsremmer (bv. heparine) behandeld volledig bloed of geïsoleerde lymfocyten worden gekweekt in aanwezigheid van een mitogeen (bv. fytohemagglutinine (PHA)), voordat ze aan de teststof en cytoB worden blootgesteld.

Metabolische activering

16. Exogene metabole activeringssystemen moeten worden gehanteerd bij het gebruik van cellen met ontoereikende endogene metabole capaciteit. Het meest gebruikte systeem is een post-mitochondriale fractie aangevuld met een cofactor (S9), verkregen uit de lever van knaagdieren die zijn behandeld met enzym-inducerende stoffen als Aroclor 1254 (45) (46) of een combinatie van fenobarbiton en β -naftoflavon (46) (47) (48) (49). De laatste combinatie druist niet in tegen het Verdrag van Stockholm inzake persistente organische verontreinigende stoffen (50) en Verordening (EG) nr. 850/2004 betreffende persistente organische verontreinigende stoffen (66). Bovendien is aangetoond dat zij even effectief is als Aroclor 1254 voor de inducering van oxidasen met gemengde functie (46) (47) (48) (49). De S9-fractie wordt meestal gebruikt bij een concentratie van 1-10 % (v/v) in het uiteindelijke medium. De omstandigheden voor het gebruik van een metabool activeringssysteem kunnen afhankelijk zijn van de aard van de geteste chemische verbinding en het kan in sommige gevallen aangewezen zijn om meer dan een S9-concentratie te gebruiken.
17. Genetisch aangepaste cellijnen waarin specifieke activeringsenzymen van mensen of knaagdieren tot expressie komen, kunnen de behoefte aan een exogeen metabool activeringssysteem elimineren en mogen als testcellen worden gebruikt. In zulke gevallen moet voor de keuze van de gebruikte cellijnen een wetenschappelijke verantwoording worden gegeven (bv. aan de hand van de relevantie van de oxidasen met gemengde functie voor het metabolisme van de teststof (51), en hun reactievermogen op bekende clastogenen en aneugenen (zie afzonderlijk gedeelte over aanvaardbaarheidscriteria). Er dient te worden erkend dat de geteste stof misschien niet wordt gemetaboliseerd door de tot expressie gekomen oxidase(n) met gemengde functie; in dit geval zouden negatieve resultaten er niet op wijzen dat de teststof geen micronuclei kan induceren.

Teststof/Bereiding

18. Vaste stoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost en, eventueel, vóór de behandeling van de cellen worden verdund. Vloeibare stoffen kunnen rechtstreeks aan het testsysteem worden toegediend en/of vóór de behandeling worden verdund. Bij het testen van gassen of vluchtige stoffen moeten geschikte aanpassingen van de standaardprotocollen worden gevolgd, zoals de behandeling in gesloten vaten (52) (53). Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen van de teststof worden gebruikt.

Testomstandigheden

Oplosmiddelen/media

19. Chemische reacties tussen het oplosmiddel/medium en de teststof moeten uitgesloten zijn of het oplosmiddel/medium moet onverminderbaar zijn met het overleven van de cellen of het behoud van de S9-activiteit bij de gebruikte concentratie. Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media (bv. water, celkweekmedium, dimethylsulfoxide) worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze verenigbaar zijn met de teststof en dat zij geen genetische toxiciteit vertonen. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt.

Gebruik van cytoB als cytokineseblokker

20. Een van de belangrijkste overwegingen bij de uitvoering van de MNvit-bepaling is ervoor te zorgen dat de cellen die worden gescoord tijdens de behandeling of de incubatieperiode na de behandeling, als deze wordt toegepast, de mitose hebben voltooid. CytoB is de stof die het meest wordt gebruikt om cytokinese te blokkeren, omdat zij de samenstelling van actine afremt en derhalve de scheiding van dochtercellen na mitose voorkomt, wat leidt tot de vorming van binucleaire cellen (5) (54) (55). Micronucleusscoring kan daarom worden beperkt tot cellen die tijdens of na behandeling mitose hebben ondergaan. Tegelijkertijd kan het effect van de teststof op de celproliferatiekinetiek worden gemeten. CytoB dient als cytokineseblokker te worden gebruikt wanneer menselijke lymfocyten worden gebruikt omdat de tijden voor de celcyclus tussen de culturen en tussen de donors variabel zullen zijn en omdat niet alle lymfocyten op PHA zullen reageren. Andere methoden zijn gebruikt tijdens het testen van cellijnen om vast te stellen of de gescoorde cellen zich gedeeld hebben; deze worden hierna besproken (zie punt 26).
21. De geschikte cytoB-concentratie dient door het laboratorium voor elk celtype te worden bepaald om de optimale frequentie van binucleaire cellen te verkrijgen in de controleculturen van de oplosmiddelen/media. De geschikte cytoB-concentratie is doorgaans tussen 3 en 6 µg/ml.

Meting van celproliferatie en cytotoxiciteit en keuze van blootstellingsconcentraties

22. Bij de bepaling van de hoogste te testen concentratie van de teststof moeten concentraties worden vermeden die kunnen leiden tot artefactuele positieve reacties, zoals reacties die bovenmatige cytotoxiciteit voortbrengen, neerslag in het cultuurmedium en uitgesproken wijzigingen in pH of osmolaliteit (39) (40) (41).
23. Metingen van celproliferatie worden verricht om er zeker van te zijn dat de behandelde cellen tijdens de bepaling mitose hebben ondergaan en dat de behandelingen worden uitgevoerd met de passende mate van cytotoxiciteit (zie punt 29). Cytotoxiciteit dient te worden bepaald met en zonder metabole activering in cellen die metabole activering nodig hebben met behulp van de relatieve toename van de celpopulatie (RICC) of de relatieve populatieverdobbeling (RPD) (zie aanhangsel 2 voor formules) tenzij cytoB wordt gebruikt. Wanneer cytoB wordt gebruikt, kan de cytotoxiciteit worden bepaald met behulp van de replicatie-index (RI) (zie aanhangsel 2 voor formule).
24. De behandeling van culturen met cytoB en de meting van de relatieve frequenties van mononucleaire, binucleaire en multinucleaire cellen in de cultuur verschaft een nauwkeurige methode om het effect van een behandeling op de celproliferatie en de cytotoxische of cytostatische activiteit te kwantificeren (5) en zorgt ervoor dat alleen cellen worden gescoord die zich tijdens of na de behandeling hebben gedeeld.
25. In studies met cytoB kan cytostase/cytotoxiciteit worden gekwantificeerd met behulp van de cytokineseblokkproliferatie-index (CBPI) (5) (26) (56) of kan deze worden afgeleid van de RI van minstens 500 cellen per cultuur (zie aanhangsel 2 voor formules). Wanneer cytoB wordt gebruikt om de celproliferatie te beoordelen, moet een CBPI of RI worden bepaald op basis van minstens 500 cellen per cultuur. Deze metingen kunnen onder meer worden gebruikt om de cytotoxiciteit te schatten door de waarden in de behandelde culturen en de controleculturen met elkaar te vergelijken. De beoordeling van andere cytotoxiciteitsmarkers (bv. aaneengroeien, aantal cellen, apoptose, necrose, metafasetelling) kan nuttige informatie opleveren.
26. In studies zonder cytoB moet worden aangetoond dat de in de cultuur gescoorde cellen deling hebben ondergaan tijdens of na de behandeling van de teststof, anders kunnen er valsnegatieve reacties worden gegenereerd. Methoden die gebruikt zijn om ervoor te zorgen dat gedeelde cellen worden gescoord zijn onder meer het inbrengen en vervolgens opsporen van broomdeoxyuridine (BrdU) om cellen met replicaat te identificeren (57), de vorming van klonen wanneer cellen van permanente cellijnen *in situ* worden behandeld en gescoord op een voorwerpplaatje van een microscoop (proliferatie-index (PI)) (25) (26) (27) (28), of de meting van de relatieve populatieverdobbeling (RPD) of relatieve toename van de celpopulatie (RICC) of andere beproefde methoden (16) (56) (58) (59) (zie aanhangsel 2 voor formules). De beoordeling van andere markers voor cytotoxiciteit of cytostase (bv. aaneengroeien, aantal cellen, apoptose, necrose, metafasetelling) kan nuttige informatie verschaffen.
27. Er moeten ten minste drie analyseerbare testconcentraties worden beoordeeld. Om dit te bereiken, kan het nodig zijn om het experiment uit te voeren met een groter aantal dicht bij elkaar liggende concentraties en de micronucleusvorming te analyseren in die concentraties die het passende bereik van cytotoxiciteiten bieden. Een alternatieve strategie bestaat erin een voorafgaande cytotoxiciteitstest uit te voeren om het bereik voor de definitieve test te beperken.
28. Bij de hoogste concentratie moet worden gestreefd naar $55 \pm 5\%$ cytotoxiciteit. Hogere niveaus kunnen leiden tot chromosoombeschadiging als neveneffect van cytotoxiciteit (60). Wanneer er cytotoxiciteit optreedt, moeten de testconcentraties een interval van $55 \pm 5\%$ cytotoxiciteit tot geen of vrijwel geen toxiciteit bestrijken.

29. Als geen cytotoxiciteit of neerslag wordt waargenomen, moet de hoogste testconcentratie overeenstemmen 0,01 M, 5 mg/mL of 5 µl/mL (de laagste van deze drie). De voor analyse geselecteerde concentraties moeten in het algemeen van elkaar gescheiden zijn door een interval van niet meer dan 10. Voor teststoffen die een steile concentratie/responscurve vertonen, zal het wellicht nodig zijn om de intervallen van de teststofconcentraties dichter bij elkaar te leggen zodat ook de culturen in het matige en lage toxiciteitsbereik gescoord zullen worden.
30. Wanneer oplosbaarheid een beperkende factor is, moet de maximale concentratie, indien niet beperkt door de cytotoxiciteit, de laagste concentratie zijn waarbij in de culturen een minimale neerslag zichtbaar is, op voorwaarde dat het scoren niet wordt verstoord. De neerslag moet worden beoordeeld aan de hand van methoden zoals onderzoek met de lichtmicroscopie, waarbij neerslag wordt vastgesteld die aanhoudt of die verschijnt tijdens de cultuur (aan het einde van de behandeling).

Controle

31. Bij elk experiment moeten tegelijkertijd positieve en oplosmiddel/medium-controles worden uitgevoerd, zowel met als zonder metabole activering.
32. Positieve controles zijn nodig om aan te tonen dat de gebruikte cellen, en het testprotocol, clastogenen en aneugenen kunnen identificeren en om de metabole capaciteit van het S9-preparaat te bevestigen. Voor de positieve controle dienen bekende induceerders van micronucleusvorming te worden gebruikt in concentraties die naar verwachting kleine, maar reproduceerbare stijgingen ten opzichte van het achtergrondniveau zullen geven en de gevoeligheid van het testsysteem aantonen. De concentraties van de positieve controle moeten zodanig worden gekozen dat de effecten duidelijk zijn maar de gecodeerde objectglaasjes niet onmiddellijk als zodanig herkenbaar zijn.
33. Een clastogeen dat metabole activering nodig heeft (bv. cyclofosfamide; benzo[a]pyreen) dient te worden gebruikt om het metabole vermogen van het testsysteem aan te tonen en om aan te tonen dat het testsysteem in staat is om clastogenen te detecteren. Ook andere positieve controles mogen worden gebruikt, maar moeten worden gerechtvaardigd. Omdat sommige positieve controles waarvoor metabole activering nodig is in bepaalde behandelingsomstandigheden of in bepaalde cellijnen actief kunnen zijn zonder exogene metabole activering, moet in de geselecteerde cellijn en bij de geselecteerde concentraties worden getest of metabole activering noodzakelijk is en of het S9-preparaat actief is.
34. Op dit ogenblik zijn er geen aneugenen bekend die metabole activering nodig hebben voor hun genotoxische activiteit (16). Positieve controles die momenteel worden erkend voor aneugene activiteit zijn bijvoorbeeld colchicine en vinblastine. Andere stoffen mogen worden gebruikt indien zij uitsluitend, of voornamelijk, door aneugene activiteit micronuclei induceren. Om te voorkomen dat er twee positieve controles (voor clastogeniciteit en aneugeniciteit) zonder metabole activering nodig zijn, kan de aneugeniciteitscontrole dienen als positieve controle zonder S9, en kan de clastogeniciteitscontrole worden gebruikt om te testen of het gebruikte metabole activeringssysteem adequaat is. Positieve controles voor zowel clastogeniciteit als aneugeniciteit moeten worden gebruikt in cellen waarvoor geen S9 nodig is. De voorgestelde positieve controles zijn opgenomen in aanhangsel 3.
35. Wanneer geschikte stoffen beschikbaar zijn, kan het gebruik van stoffen uit een verwante chemische klasse als positieve controle worden overwogen. Alle angewende positieve controles dienen geschikt te zijn voor het celtypen en de activeringsomstandigheden.
36. Voor elk oogsttijdstip dienen oplosmiddel/medium-controles in het experiment te worden opgenomen. Daarnaast moeten er ook onbehandelde negatieve controles (zonder oplosmiddel/medium) worden gebruikt, tenzij in het verleden in het laboratorium of in de literatuur reeds is aangetoond dat het gekozen oplosmiddel geen genotoxische of andere schadelijke effecten veroorzaakt.

UITVOERING VAN DE PROEF

Behandelingsschema

37. Voor een maximale kans op detectie van een aneugeen of clastogeen dat actief is in een specifiek stadium in de celcyclus, is het belangrijk dat voldoende aantallen cellen tijdens alle stadia van hun celcyclus met de teststof worden behandeld. Het behandelingsschema voor cellijnen en primaire celculturen kan daarom enigszins verschillen van dat voor lymfocyten die mitogene stimulering nodig hebben om hun celcyclus aan te vatten - deze worden besproken in punten 41-43 (16).
38. Theoretische overwegingen en gegevens uit de literatuur (18) wijzen erop dat de meeste aneugenen en clastogenen zullen worden gedetecteerd in een korte behandelingsperiode van 3 tot 6 uur in aanwezigheid en afwezigheid van S9, gevolgd door de verwijdering van de teststof en een groeiperiode van 1,5 - 2,0 celcycli (6). Cellen worden bemonsterd op een tijdstip dat overeenkomt met ongeveer 1,5 - 2,0 maal de normale (d.w.z. onbehandelde) lengte van een celcyclus na het begin of aan het einde van de behandeling (zie tabel 1). De bemonsterings- of hersteltijden kunnen worden verlengd als bekend is of vermoed wordt dat de teststof de celcyclusduur beïnvloedt (bv. bij het testen van nucleosideanalogen).

39. Omwille van de mogelijke cytotoxiciteit van S9-preparaten voor gekweekte zoogdiercellen, wordt een verlengde blootstellingsbehandeling van 1,5 - 2,0 normale celcycli alleen gebruikt zonder S9. Bij de verlengde behandeling worden keuzes geboden om de behandeling van de cellen met de teststof toe te staan met of zonder cytoB. Deze keuzes zijn bedoeld voor situaties waarin ongerustheid kan bestaan over mogelijke interacties tussen de teststof en cytoB.
40. De voorgestelde celbehandelingsschema's zijn weergegeven in tabel 1. Deze algemene behandelingsschema's kunnen worden gewijzigd afhankelijk van de stabiliteit of reactiviteit van de teststof of de bijzondere groeikenmerken van de gebruikte cellen. Alle behandelingen dienen te beginnen en te eindigen terwijl de cellen exponentieel groeien. Deze schema's worden uitvoeriger besproken in punten 41-47.

Tabel 1

Celbehandeling en oogsttijdstippen voor de MNvit-bepaling

Lymfocyten, primaire cellen en cellijnen behandeld met cytoB	+ S9	3-6 uur behandelen in aanwezigheid van S9; de S9 en het behandelingsmedium verwijderen; vers medium en cytoB toevoegen; 1,5 - 2,0 normale celcycli daarna oogsten.
	- S9 Korte blootstelling	3-6 uur behandelen; het behandelingsmedium verwijderen; vers medium en cytoB toevoegen; 1,5 - 2,0 normale celcycli daarna oogsten.
	- S9 Verlengde blootstelling	Optie A: Gedurende 1,5 - 2 normale celcycli behandelen in aanwezigheid van cytoB; oogsten aan het einde van de blootstellingsperiode. Optie B: Gedurende 1,5 - 2,0 normale celcycli behandelen; de teststof verwijderen; vers medium en cytoB toevoegen; 1,5 - 2,0 normale celcycli daarna oogsten.

Cellijnen behandeld zonder cytoB

(Identiek aan de hierboven geschetste behandelingsschema's met de uitzondering dat geen cytoB wordt toegevoegd)

Lymfocyten, primaire cellen en cellijnen met cytoB

41. Wat lymfocyten betreft is de doeltreffendste aanpak de blootstelling aan de teststof 44-48 uur na de PHA-stimulering te starten, wanneer de cyclussynchronisatie verdwenen is (5). In de voorlopige bepaling worden cellen gedurende 3 tot 6 uur zowel met als zonder S9 met de teststof behandeld. Het behandelingsmedium wordt verwijderd en vervangen door vers medium met cytoB, en de cellen worden 1,5 - 2,0 normale celcycli later geoogst.
42. Als beide voorlopige tests met de korte (3-6 uur) behandeling negatief of onduidelijk zijn, wordt een volgende behandeling met langere blootstelling, zonder S9 gebruikt. Er zijn twee behandelingskeuzes mogelijk die allebei aanvaardbaar zijn. Het kan echter passender zijn om voor optie A te kiezen voor gestimuleerde lymfocyten wanneer de exponentiële groei 96 uur na de stimulering mogelijk afneemt. De celculturen mogen ook niet samengevloeid zijn op het ogenblik dat in optie B het laatste monster wordt genomen.
- Optie A: de cellen worden gedurende 1,5 - 2,0 normale celcycli met de teststof behandeld en aan het einde van de behandelingstijd geoogst.
 - Optie B: de cellen worden gedurende 1,5 - 2,0 normale celcycli met de teststof behandeld. Het behandelingsmedium wordt verwijderd en vervangen door vers medium, en de cellen worden na bijkomende 1,5 - 2,0 normale celcycli geoogst.
43. Primaire cellen en cellijnen dienen op een gelijkaardige wijze te worden behandeld als lymfocyten behalve dat het niet nodig is ze gedurende 44-48 uur met PHA te stimuleren. Andere cellen dan lymfocyten dienen zo te worden blootgesteld dat de cellen zich op het ogenblik waarop de studie eindigt nog in log-fasegroei bevinden.

Cellijnen zonder cytoB

44. Cellen dienen 3-6 uur zowel met als zonder S9 te worden behandeld. Het behandelingsmedium wordt verwijderd en vervangen door vers medium, en de cellen worden 1,5 - 2,0 normale celcycli daarna geoogst.
45. Als beide voorlopige tests met de korte (3-6 uur) behandeling negatief of onduidelijk zijn, wordt een volgende behandeling met langere blootstelling (zonder S9) gebruikt. Er zijn twee behandelingskeuzes mogelijk die allebei even aanvaardbaar zijn:
- Optie A: de cellen worden gedurende 1,5 - 2,0 normale celcycli met de teststof behandeld en aan het einde van de behandelingstijd geoogst.
 - Optie B: de cellen worden gedurende 1,5 - 2,0 normale celcycli met de teststof behandeld. Het behandelingsmedium wordt verwijderd en vervangen door vers medium, en de cellen worden na bijkomende 1,5 - 2,0 normale celcycli geoogst.
46. In monolagen kunnen aan het einde van de 3-6 uur durende behandeling mitotische cellen (herkenbaar aan hun ronde vorm en het feit dat ze loslaten van het oppervlak) aanwezig zijn. Omdat deze mitotische cellen gemakkelijk loskomen, kunnen ze verloren gaan wanneer het medium met de teststof wordt verwijderd. Daarom moeten deze cellen zorgvuldig worden verzameld wanneer de culturen worden gewassen, en vervolgens terug in de culturen gebracht, opdat er geen cellen in mitose, en die gevaar voor micronuclei lopen, op het oogsttijdstip verloren gaan.

Aantal culturen

47. Voor elke concentratie van de teststof en voor culturen met het medium/de oplossing en culturen met negatieve controle moeten twee culturen worden gebruikt. Wanneer aan de hand van laboratoriumgegevens uit het verleden kan worden aangetoond dat de verschillen tussen duploculturen minimaal zijn, kan het gebruik van één cultuur voor elke concentratie aanvaardbaar zijn. Wanneer één cultuur wordt gebruikt, wordt aanbevolen om een hoger aantal concentraties te analyseren.

Oogsten van de cellen en bereiding van de objectglaasjes

48. Elke cultuur wordt afzonderlijk geoogst en verwerkt. Het prepareren van de cellen kan een hypotone behandeling inhouden, maar deze stap is niet nodig als op een andere manier toereikende cellenspreiding wordt gerealiseerd. Verschillende technieken kunnen worden gebruikt bij de bereiding van de objectglaasjes op voorwaarde dat er voor het scoren hoogwaardige celpreparaten worden verkregen. Het celcytoplasma moet behouden blijven om de detectie van micronuclei en (in de methode met cytokineseblokker) betrouwbare identificatie van binucleaire cellen mogelijk te maken.
49. De objectglaasjes kunnen worden gekleurd met behulp van diverse methoden, zoals Giemsa of fluorescerende DNA-specifieke kleurstoffen (59). Door het gebruik van een DNA-specifieke kleurstof (bv. acridine oranje (61) of Hoechst 33258 plus pyronine-Y (62)) kunnen sommige artefacten die zich bij het gebruik van niet voor DNA specifieke kleurstoffen kunnen voordoen, worden voorkomen. Antikinetochore antilichamen, FISH met pancentromere DNA-proben of geprepareerde *in situ* labeling met pancentromeer-specifieke primers, samen met de passende DNA-tegenkleuring, kunnen worden gebruikt om de inhoud (chromosoom/chromosoomfragment) van micronuclei te identificeren indien de mechanistische informatie over hun vorming van belang is (15) (16). Andere methoden voor differentiatie tussen clastogenen en aneugenen kunnen worden gebruikt indien is aangetoond dat zij doeltreffend zijn.

Analyse

50. Alle objectglaasjes, ook die van het oplosmiddel/medium en de controles, worden vóór de microscopische analyse onafhankelijk gecodeerd. Volgens een alternatieve methode kunnen gecodeerde monsters worden geanalyseerd met behulp van een gevalideerde automatische stromingscytometer of een beeldanalysesysteem.
51. In met cytoB behandelde culturen moeten de micronucleusfrequenties worden geanalyseerd in ten minste 2 000 binucleaire cellen per concentratie (ten minste 1 000 binucleaire cellen per cultuur; twee culturen per concentratie). Indien één cultuur wordt gebruikt, moeten ten minste 2 000 binucleaire cellen per concentratie van die cultuur worden gescoord. Als er in elke concentratie aanzienlijk minder dan 1 000 binucleaire cellen per cultuur, of 2 000 bij gebruik van één cultuur, beschikbaar zijn voor scoring, en als er geen aanzienlijke toename van micronuclei wordt gedetecteerd, moet de test worden herhaald met behulp van meer cellen, of met minder toxische concentraties, naargelang het geval. Er moet gezorgd worden dat er geen binucleaire cellen met onregelmatige vorm worden gescoord of cellen waarvan de twee nucleï sterk in grootte verschillen; ook mogen binucleaire cellen niet worden verward met slecht verspreide multinucleaire cellen. Cellen die meer dan twee hoofdnucleï bevatten, mogen niet op micronuclei worden geanalyseerd, aangezien de basismicronucleusfrequentie in deze cellen hoger kan zijn (63) (64). Het scoren van mononucleaire cellen is aanvaardbaar indien is aangetoond dat de teststof de cytoB-activiteit stoort.

52. In cellijnen die zonder behandeling met cytoB worden bepaald, moeten micronuclei worden gescoord in ten minste 2 000 cellen per concentratie (ten minste 1 000 cellen per cultuur; twee culturen per concentratie). Wanneer slechts één cultuur per concentratie wordt gebruikt, moeten ten minste 2 000 cellen van die cultuur worden gescoord.
53. Wanneer cytoB wordt gebruikt, moet een CBPI of een RI worden vastgesteld om de celproliferatie te beoordelen (zie aanhangsel 2) met behulp van ten minste 500 cellen per cultuur. Wanneer de behandelingen worden uitgevoerd zonder cytoB, is het essentieel dat er bewijs wordt geleverd dat de cellen die gescoord worden zich hebben voortgeplant, zoals besproken in punten 24-27.

Aanvaardbaarheidscriteria

54. Een laboratorium dat voorstelt om de in deze testmethode beschreven MNvit-bepaling te gebruiken, dient aan te tonen dat het in staat is om op betrouwbare en nauwkeurige wijze stoffen met bekende aneugene en clastogene activiteit te detecteren, met en zonder metabole activering, evenals bekende negatieve stoffen, met behulp van de referentiestoffen in aanhangsel 3. Als bewijs van zijn vermogen om deze testmethode correct uit te voeren, dient het laboratorium bewijs te leveren dat de cellen die voor micronucleusvorming worden gescoord één kerndeling hebben voltooid indien de test wordt uitgevoerd zonder gebruik van cytoB.
55. De chemische stoffen in aanhangsel 3 worden aanbevolen voor gebruik als referentiestoffen. Vervangende of aanvullende stoffen kunnen worden opgenomen als hun activiteit bekend is en als ze micronuclei induceren met behulp van dezelfde actiemechanismen, en als wordt aangetoond dat zij relevant zijn voor de stoffen die met behulp van de MNvit-procedure zullen worden getest. De rechtvaardiging kan bestaan in een valideringsonderzoek dat gebruikmaakt van een brede keuze aan stoffen of dat gericht is op een smaller spectrum op basis van de chemische klasse van de teststof of het beschadigingsmechanisme dat wordt onderzocht.
56. Oplosmiddel/mediumcontrole en onbehandelde culturen dienen reproduceerbaar lage en consistente micronuclei frequenties op te leveren (doorgaans 5-25 micronuclei/1 000 cellen voor de celtypen die zijn geïdentificeerd in punt 11). Andere celtypen kunnen verschillende responsbereiken vertonen die moeten worden bepaald tijdens hun validering voor gebruik in de MNvit-bepaling. Gegevens van negatieve controle, oplosmiddelcontrole en positieve controle moeten worden aangewend om historische controlebereiken vast te stellen. Deze gegevens moeten worden gebruikt om te beslissen over de geschiktheid van de gelijktijdig uitgevoerde negatieve/positieve controles voor een experiment.
57. Indien voor de bepaling kleine wijzigingen aan het protocol (bv. gebruik van automatische in plaats van handmatige scoringstechnieken; gebruik van een nieuw celtype) worden voorgesteld, moet de doeltreffendheid van de wijziging worden aangetoond voordat het gewijzigde protocol aanvaardbaar voor gebruik kan worden geacht. Aantonen dat het gewijzigde protocol doeltreffend is, omvat aantonen dat de belangrijkste mechanismen van chromosoombreuken en chromosoomwinst of -verlies kunnen worden gedetecteerd en dat passende positieve en negatieve resultaten kunnen worden bereikt voor de klasse van de individuele stof, of het brede bereik van de stoffen die getest moet(en) worden.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verwerking van de resultaten

58. Als de techniek met de cytokineseblokker wordt gebruikt, worden alleen de frequenties van binucleaire cellen met micronuclei (onafhankelijk van het aantal micronuclei per cel) gebruikt bij de evaluatie van micronucleusinductie. Het scoren van de aantallen cellen met één, twee of meer micronuclei kan nuttige informatie opleveren, maar is niet verplicht.
59. Gelijktijdige metingen van de cytotoxiciteit en/of cytostase voor alle behandelde en oplosmiddel/medium controleculturen dienen te worden vastgesteld (58). De CBPI of RI moeten worden berekend voor alle behandelde en controleculturen als meting van celcyclusvertraging wanneer de methode met de cytokineseblokker wordt gebruikt. Als er geen cytoB wordt gebruikt, moeten de RPD of de RICC of PI worden gebruikt (zie aanhangsel 2).
60. De gegevens moeten voor elke cultuur apart worden verstrekt. Daarnaast moet een overzicht van alle gegevens in tabelvorm worden gegeven.
61. Stoffen die micronuclei in de MNvit-bepaling induceren, kunnen dit doen omdat ze chromosoombreuken, chromosoomverlies of een combinatie van beide induceren. Verdere analyse aan de hand van antikinetochore antilichamen, centromeerspecifieke *in situ* proben of andere methoden mogen worden gebruikt om vast te stellen of het mechanisme van micronucleusinductie te wijten is aan clastogene en/of aneugene activiteit.

Evaluatie en interpretatie van de resultaten

62. Een duidelijk positieve of negatieve reactie hoeft niet te worden bevestigd door aanvullende tests. Onduidelijke resultaten kunnen worden opgehelderd door de analyse van nogmaals 1 000 cellen uit alle culturen om verlies van blinding te voorkomen. Indien deze aanpak geen oplossing biedt voor het resultaat, moeten verdere testen worden verricht. Bij vervolgetperimenten dient wijziging van parameters te worden overwogen om, indien nodig, de bepaling uit te breiden tot een breder scala van omstandigheden. Parameters die voor wijziging in aanmerking komen zijn bijvoorbeeld de testconcentratie-intervallen, de tijdstippen van behandeling en oogst van de cellen en de omstandigheden bij metabole activering.

63. Er zijn verschillende criteria om tot een positief resultaat te besluiten, zoals een concentratieafhankelijke of een statistisch significante stijging van het aantal cellen met micronuclei. In eerste instantie moet naar de biologische relevantie van de resultaten worden gekeken. De overweging of de waargenomen waarden binnen of buiten het historische controlebereik vallen, kan als leidraad dienen tijdens de beoordeling van de biologische relevantie van de respons. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen passende statistische methoden worden gebruikt (65). De resultaten van statistische tests moeten echter worden beoordeeld met betrekking tot de dosis-effectrelatie. Reproduceerbaarheid en gegevens uit het verleden moeten ook in aanmerking worden genomen.
64. Hoewel de meeste experimenten duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in sommige gevallen onmogelijk zijn. Deze onduidelijke of twijfelachtige responsen kunnen zich blijven voordoen, hoe vaak het experiment ook wordt herhaald.
65. Positieve resultaten bij de MNvit-bepaling wijzen erop dat de teststof in gekweekte zoogdiercellen chromosoombreuk of chromosoomverlies induceert. Negatieve resultaten wijzen erop dat de stof onder de testomstandigheden in gekweekte zoogdiercellen geen chromosoombreuken en/of chromosoomwinst of -verlies induceert.

Testverslag

66. Het testverslag dient ten minste de volgende informatie te bevatten, indien relevant voor het voeren van het onderzoek:

Onderzochte stof:

- identificatiegegevens, nummer bij de Chemical Abstracts Service (CAS) en EG-nummer;
- fysische toestand en zuiverheid;
- fysisch-chemische eigenschappen die voor de uitvoering van het onderzoek relevant zijn;
- reactiviteit van de teststof met het oplosmiddel/medium of de celcultuurmedia;

Oplosmiddel/Medium:

- motivering voor de keuze van het oplosmiddel/medium;
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium;

Cellen:

- type en bron van de gebruikte cellen;
- bruikbaarheid van het gebruikte celtype;
- afwezigheid van mycoplasma, indien van toepassing;
- informatie over de lengte van de celcyclus, verdubbelingstijd of proliferatie-index;
- wanneer er lymfocyten worden gebruikt, het geslacht, de leeftijd en het aantal bloeddonors, indien van toepassing;
- indien lymfocyten worden gebruikt, of volledig bloed dan wel geïsoleerde lymfocyten zijn blootgesteld;
- aantal overentingen, indien van toepassing;
- methoden om de celculturen in leven te houden, indien van toepassing;
- modaal aantal chromosomen;
- normale tijd voor de celcyclus (negatieve controle);

Testomstandigheden:

- naam van de cytokinesblokker (bv. cytoB), indien gebruikt, de concentratie ervan en de blootstellingsduur;
- achtergrond voor de keuze van de concentraties en het aantal culturen, met inbegrip van gegevens over de cytotoxiciteit en beperkte oplosbaarheid, indien beschikbaar;

- samenstelling van het medium en CO₂-concentratie, indien van toepassing;
- concentraties van de teststof;
- toegevoegde concentratie (en/of volume) van het medium en de teststof;
- incubatietemperatuur en -tijd;
- duur van de behandeling;
- oogsttijdstip na behandeling;
- celdichtheid bij het enten, indien van toepassing;
- aard en samenstelling van het metabool activeringssysteem, met inbegrip van aanvaardbaarheidscriteria;
- positieve controlestoffen en negatieve controles;
- gebruikte methoden voor de bereiding van de objectglaasjes en kleuringstechniek.
- criteria voor micronucleusidentificatie;
- aantal geanalyseerde cellen;
- methoden voor de meting van de cytotoxiciteit;
- eventuele aanvullende gegevens met betrekking tot de cytotoxiciteit;
- criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is;
- toegepaste methode(n) van statistische analyse;
- methoden, zoals het gebruik van een kinetochoor-antilichaam, om na te gaan of micronuclei volledige of gedeeltelijke chromosomen bevatten, indien van toepassing;

Resultaten:

- toegepaste meting van cytotoxiciteit, bv. CBPI of RI in het geval van de methode met cytokineseblokker; RICC, RPD of PI wanneer de methoden met cytokineseblokker niet worden toegepast; andere waarnemingen wanneer van toepassing, bv. aaneengroei van cellen, apoptose, necrose, metafasetelling, frequentie van binucleaire cellen;
- neerslagverschijnselen;
- gegevens over de pH en de osmolaliteit van het behandelingsmedium, indien bepaald;
- definitie van aanvaardbare cellen voor analyse;
- distributie van mono-, bi- en multinucleaire cellen indien een methode met cytokineseblokker wordt toegepast;
- aantal cellen met micronuclei, afzonderlijk vermeld voor elke behandelde en controlecultuur, en bepaling of deze behoren tot binucleaire of mononucleaire cellen, indien van toepassing;
- indien mogelijk het verband tussen concentratie en respons;
- scheikundige gegevens (concentraties en oplosmiddelen) over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles;
- scheikundige gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles met vermelding van spreiding, gemiddelde, standaardafwijking en betrouwbaarheidsinterval (bv. 95 %);
- statistische analyse; eventuele p-waarden;

Bespreking van de resultaten

Conclusies

LITERATUUR

- (1) Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.*, 392, 1-4.
- (2) Parry, J.M. and Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, *Mutation Res.*, 287, 3-15.
- (3) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios.*, 43, 233-246.
- (4) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2000), Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 167-172.
- (5) Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols*, 2(5), 1084-1104.
- (6) Fenech, M. and Morley, A.A. (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Res.*, 161, 193-198.
- (7) Eastmond, D.A. and Tucker, J.D. (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 34-43.
- (8) Eastmond, D.A. and Pinkel, D. (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes, *Mutation Res.*, 234, 9-20.
- (9) Miller, B.M., Zitzelsberger, H.F., Weier, H.U. and Adler, I.D. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using Crest antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, 6, 297-302.
- (10) Farooqi, Z., Darroudi, F. and Natarajan, A.T. (1993), The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneuploids in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesis*, 8, 329-334.
- (11) Migliore, L., Boccardi, R., Macri, C. and Lo Jacono, F. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe, *Mutation Res.*, 319, 205-213.
- (12) Norppa, H., Renzi, L. and Lindholm, C. (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochores staining and *in situ* hybridization, *Mutagenesis*, 8, 519-525.
- (13) Eastmond, D.A., Rupa, D.S. and Hasegawa, L.S. (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes, *Mutation Res.*, 322, 9-20.
- (14) Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J. and Bentley, K.S. (1996), Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Res.*, 372, 233-245.
- (15) Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. and Crebelli, R. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Res.*, 372, 211-219.
- (16) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2003), Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.*, 540, 153-163.
- (17) OECD (1997), *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*, Test Guideline No. 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [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, Available at: [<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., Vanparys P. (2008), ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT), *Mutagenesis*, 23, 271-283.
- (35) Zhang, L.S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. and Sofuni, T. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, 105-115.
- (36) Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. and Knasmeuller, S. (2002), Fumonisin B₁ is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, *Mutagenesis*, 17, 257-260.
- (37) Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J. and Majer, B.J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge, *Toxicol.*, 198, 315-328.
- (38) Gibson, D.P., Brauningner, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. and Aardema, M.J. (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, *Mutation Res.*, 392, 61-70.
- (39) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, 147-205.
- (40) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 268, 297-305.
- (41) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environ. Mutagen.*, 8, 789-886.
- (42) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Res.*, 147, 29-36.
- (43) Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, *Mutation Res.*, 392, 11-18.
- (44) Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. (2001), HUMAN MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, *Environ. Mol. Mutagen.* 37, 31-45.
- (45) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215.
- (46) Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C.R. and Zeiger, E. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55-65.
- (47) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.
- (48) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, In: de Serres, F.J., Fouts, J. R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, 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). Available at: [<http://www.pops.int/>]

- (51) Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M. and Parry, J.M. (1996), An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, *Mutagenesis*, 11, 247-274.
- (52) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, In: Tice, R.R., Costa, D.L. and Schaich, K.M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, pp. 91-103.
- (53) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983), Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay, *Environ. Mutagenesis* 5, 795-801.
- (54) Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Res.*, 285, 35-44.
- (55) Phelps, J.B., Garriott, M.L., and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 521, 103-112.
- (56) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A. (2004), Corrigendum to „Report from the *in vitro* micronucleus assay working group”, *Mutation Res.*, 564, 97-100.
- (57) Pincu, M., Bass, D. and Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.*, 139, 61-65.
- (58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. and Kirkland, D. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Res.*, 655, 1-3.
- (59) Surrallés, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. and Marcos, R. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 341, 169-184.
- (60) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environ. Molec. Mutagenesis* 35, 191-201.
- (61) Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.
- (62) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, 269-275.
- (63) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.
- (64) Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 534, 65-75.
- (65) Hoffman, W.P., Garriott, M.L. and Lee, C. (2003), *In vitro* micronucleus test, In: *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp. 463-467.
- (66) Regulation (EC) No 850/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 april 2004 on persistent organic pollutants and amending Directive 79/117/EEC, OJ L 229, 30.4.2004, p. 5.

Aanhangsel 1

Definities

Aneugeen: elke stof die of elk proces dat leidt tot aneuploidie in cellen of organismen door de wisselwerking met componenten van de mitose en meiose in de celdelingscyclus.

Aneuploidie: elke afwijking van het normale diploïde (of haploïde) aantal chromosomen met één chromosoom of meer dan één chromosoom, maar niet met (een) volledige reeks(en) chromosomen (polyploidie).

Apoptose: geprogrammeerde celdood, gekenmerkt door een reeks stappen die leiden tot de afbraak van cellen in door membraan samengehouden deeltjes die vervolgens worden geëlimineerd door fagocytose of door verwijdering.

Celproliferatie: toename van het aantal cellen als gevolg van mitose.

Centromeer: DNA-plek van een chromosoom waar beide chromatiden worden samengehouden en waar beide kinetochoren zij aan zij zijn aangehecht.

Clastogeen: elke stof die of elk proces dat structurele chromosoomafwijkingen veroorzaakt in celpopulaties of organismen.

Cytokinese: deling van de cel onmiddellijk na de mitose, waarbij twee dochtercellen worden gevormd die elk één nucleus bevatten.

Cytokineseblokproliferatie-index (CBPI): de verhouding cellen na tweede deling in de behandelde populatie ten opzichte van de onbehandelde controlegroep (zie aanhangsel 2 voor formule).

Cytostase: afremming van celgroei (zie aanhangsel 2 voor formule).

Cytotoxiciteit: schadelijke gevolgen voor de celstructuur of -functie die uiteindelijk celdood veroorzaken.

Genotoxisch: een algemene term die alle typen DNA- of chromosoombeschadiging omvat, waaronder breuken, adduct-herschikkingen, mutaties, chromosoomafwijkingen en aneuploidie. Niet alle soorten genotoxische effecten leiden tot mutaties of stabiele chromosoombeschadiging.

Interfasecellen: cellen die zich niet in het stadium van de mitose bevinden.

Kinetochoor: een hoofdzakelijk uit eiwitten bestaande structuur die zich assembleert nabij het centromeer van een chromosoom en waar tijdens de celdeling de spoeldraden aan vastzitten, zodat de verplaatsing van de dochterchromosomen naar de polen van de dochtercellen regelmatig kan verlopen.

Micronucleus: kleine kern die buiten en naast de hoofdkern van cellen tijdens de telofase van de mitose of meiose ontstaat door achtergebleven chromosoomfragmenten of volledige chromosomen.

Mitose: deling van de celkern die doorgaans wordt ingedeeld in profase, prometafase, metafase, anafase en telofase.

Mitotische index: de verhouding tussen het aantal cellen in de metafase en het totale aantal cellen in een populatie; deze index geeft een indicatie van de snelheid waarmee deze populatie groeit.

Mutageen: produceert een erfelijke wijziging van DNA-basepaarsequentie(s) in genen of van de structuur van chromosomen (chromosoomafwijkingen).

Non-disjunctie: het feit dat de chromatiden niet uit elkaar gaan en niet afzonderlijk overgaan in de dochtercellen in ontwikkeling, wat leidt tot dochtercellen met abnormale chromosoomaantallen.

Polyploidie: afwijkingen in het aantal chromosomen in cellen of organismen waarbij (een) volledige reeks(en) van chromosomen betrokken is/zijn, in tegenstelling tot een afzonderlijk chromosoom of afzonderlijke chromosomen (aneuploidie).

Proliferatie-index (PI): methode voor cytotoxiciteitsmeting wanneer geen cytoB wordt gebruikt (zie aanhangsel 2 voor formule).

Relatieve toename van de celpopulatie (RICC): methode voor cytotoxiciteitsmeting wanneer geen cytoB wordt gebruikt (zie aanhangsel 2 voor formule).

Relatieve populatieverdubbeling (RPD): methode voor cytotoxiciteitsmeting wanneer geen cytoB wordt gebruikt (zie aanhangsel 2 voor formule).

Replicatie-index (RI): de verhouding tussen het aantal voltooid celdelingscycli in een behandelde cultuur en het aantal voltooid celdelingscycli in de onbehandelde controlegroep, tijdens de blootstellingsperiode en het herstel (zie aanhangsel 2 voor formule).

Teststof: iedere stof of ieder mengsel die/dat met deze TM wordt getest.

Aanhangsel 2

Formules voor beoordeling van de cytotoxiciteit

1. Wanneer cytoB wordt gebruikt, moet de evaluatie van de cytotoxiciteit uitgaan van de cytokineseblokproliferatie-index (CBPI) of replicatie-index (RI) (16) (58). De CBPI geeft het gemiddelde aantal celcycli per cel aan tijdens de periode van blootstelling aan cytoB en kan worden gebruikt om de celproliferatie te berekenen. De RI geeft het relatieve aantal nuclei in behandelde culturen in vergelijking met de controreculturen aan en kan worden gebruikt om het % cytostase te berekenen:

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

en:

T = cultuur behandeld met teststof

C = controrecultuur behandeld met medium

waarbij:

$$CBPI = \frac{((\text{Aantal mononucleaire cellen}) + (2 \times \text{aantal binucleaire cellen}) + (3 \times \text{aantal multinucleaire cellen}))}{(\text{Totaal aantal cellen})}$$

Zo is een CBPI van 1 (alle cellen zijn mononucleair) gelijk aan 100 % cytostase.

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

$$RI = \frac{((\text{Aantal binucleaire cellen}) + (2 \times \text{aantal multinucleaire cellen})) \div (\text{totaal aantal cellen})_T}{((\text{Aantal binucleaire cellen}) + (2 \times \text{aantal multinucleaire cellen})) \div (\text{totaal aantal cellen})_C} \times 100$$

T = behandelde culturen

C = controreculturen

2. Zo betekent een RI van 53 % dat, in vergelijking met het aantal cellen van de controrecultuur die zich gedeeld hebben om binucleaire en multinucleaire cellen te vormen, slechts 53 % van dit aantal in de behandelde cultuur zich heeft gedeeld, d.w.z. 47 % cytostase.

3. Wanneer geen cytoB wordt gebruikt, wordt aanbevolen om de cytotoxiciteit te beoordelen op basis van de relatieve toename van de celpopulatie (RICC) of de relatieve populatieverdubbeling (RPD) (58) aangezien beide rekening houden met het percentage van de celpopulatie dat zich gedeeld heeft.

$$RICC = \frac{(\text{Toename aantal cellen in behandelde culturen (eindsituatie - beginsituatie)})}{(\text{Toename aantal cellen in controreculturen (eindsituatie - beginsituatie)})} \times 100$$

$$RPD = \frac{(\text{Aantal populatieverdubbelingen in behandelde culturen})}{(\text{Aantal populatieverdubbelingen in controreculturen})} \times 100$$

waarbij:

$$\text{Populatieverdubbeling} = [\log (\text{aantal cellen na behandeling} \div \text{aanvankelijk aantal cellen})] \div \log 2$$

4. Zo geeft een RICC of een RPD van 53 % aan dat de cytotoxiciteit/cytostase 47 % bedraagt.

5. Met behulp van een proliferatie-index (PI) kan de cytotoxiciteit worden beoordeeld door het aantal klonen te tellen dat bestaat uit 1 cel (cl1), 2 cellen (cl2), 3 tot 4 cellen (cl4) en 5 tot 8 cellen (cl8)

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

6. De PI is ook toegepast als waardevolle en betrouwbare cytotoxiciteitsparameter voor *in situ* gekweekte cellijnen in afwezigheid van cytoB (25) (26) (27) (28).

Aanhangsel 3

Aanbevolen referentiestoffen voor het beoordelen van de prestaties ⁽¹⁾

Categorie	Chemische stof	CAS-nr.	EG-nr.
1. Clastogenen werkzaam zonder metabolische activering			
	Cytosine arabinoside	147-94-4	205-705-9
	Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
2. Clastogenen waarvoor metabolische activering vereist is			
	Benzo(a)pyreen	50-32-8	200-028-5
	Cyclofosfamide	50-18-0	200-015-4
3. Aneugenen			
	Colchicine	64-86-8	200-598-5
	Vinblastine	143-67-9	205-606-0
4. Negatieve stoffen			
	Di(2-ethylhexyl)ftalaat	117-81-7	204-211-0
	Nalidixinezuur	389-08-2	206-864-7
	Pyreen	129-00-0	204-927-3
	Natriumchloride	7647-14-5	231-598-3

⁽¹⁾ Het wordt aanbevolen om de referentiestoffen te gebruiken. Het is mogelijk om chemische stoffen op de lijst van referentiestoffen te vervangen of toe te voegen als hun werkzaamheid gekend is en als zij via dezelfde werkwijze micronucleï doen ontstaan, en als zij relevant blijken voor de chemische stoffen die tijdens de MNvit-procedure getest zullen worden. Afhankelijk van het doel kan de rechtvaardiging ook bestaan in een valideringsonderzoek dat gebruikmaakt van een brede keuze aan stoffen of dat gericht is op een smaller spectrum op basis van de chemische klasse van de teststof of het beschadigingsmechanisme dat wordt onderzocht.

B.50. HUIDSENSIBILISATIE: LOKALE LYMFKLIERTEST: AA

INLEIDING

- De OESO-richtlijnen inzake het testen van chemische stoffen (Guidelines for the Testing of Chemicals) en de daarop gebaseerde EU-testmethoden worden regelmatig herzien in het licht van de wetenschappelijke vooruitgang, zich wijzigende behoeften aan regelgeving en overwegingen met het oog op dierenwelzijn. De eerste testmethode (TM) (B.42) voor het bepalen van de huidsensibilisatie bij muizen, de lokale lymfkliertest (LLKT; OESO-testrichtlijn 429) is herzien (1). Er zijn publicaties verschenen met de gegevens over de validering van de LLKT en een overzicht van gerelateerd onderzoek (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). In de LLKT wordt radio-isotoop thymidine of jodium gebruikt om de proliferatie van de lymfocyten te meten en de test is daarom slechts beperkt bruikbaar indien de aankoop, het gebruik en de verwijdering van radioactief materiaal problematisch zijn. De LLKT: AA (afvoerend auriculair) (ontwikkeld door Daicel Chemical Industries, Ltd) is een niet-radioactieve aanpassing van de LLKT, waarin het adenosinetrifosfaat (ATP)-gehalte gemeten wordt via bioluminescentie, als indicator voor de proliferatie van lymfocyten. De LLKT: AA-testmethode werd door een internationaal panel voor collegiale toetsing gevalideerd, beoordeeld en aanbevolen als nuttig instrument om huidsensibiliserende en niet-huidsensibiliserende chemische stoffen op te sporen, binnen bepaalde beperkingen (10) (11) (12) (13). Deze TM werd ontworpen om de potentiële huidsensibilisatie door chemische stoffen (stoffen en mengsels) bij dieren te bepalen. In hoofdstuk B.6 van de bijlage en in OESO-testrichtlijn 406 worden proeven met cavia's gebruikt: de maximalisatietest en de Buehlertest (14). De LLKT (hoofdstuk B.42 van deze bijlage; OESO-testrichtlijn 429) en de twee niet-radioactieve aanpassingen, LLKT: AA (hoofdstuk B.50 van deze bijlage; OESO-testrichtlijn 442 A) en LLKT: BrdU-ELISA (hoofdstuk B.51 van deze bijlage; OESO-testrichtlijn 442 B), bieden allemaal een voordeel ten opzichte van de proeven met cavia's in B.6 en OESO-testrichtlijn 406 (14) ten aanzien van een beperking en verfijning van het gebruik van dieren.
- NET zoals de LLKT, bestudeert het LLKT: AA-onderzoek de inductiefase van huidsensibilisatie en levert kwantitatieve gegevens die voor een dosis/responsbepaling kunnen worden gebruikt. Bovendien neemt de mogelijkheid om huidsensibiliserende stoffen op te sporen zonder gebruik te maken van isotopenmerking voor DNA het risico op beroeps-matige blootstelling aan radioactiviteit en de problemen met afvalverwijdering weg. Dat maakt het dan weer mogelijk om vaker muizen te gebruiken om huidsensibiliserende stoffen op te sporen, waardoor het gebruik van cavia's in onderzoek naar huidsensibilisatie mogelijk beperkt kan worden (i.e. B.6; OESO-testrichtlijn 406) (14).

DEFINITIES

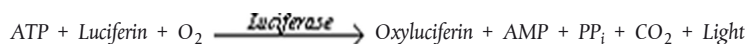
- Gebruikte definities worden gegeven in aanhangsel 1.

TOELICHTING EN BEPERKINGEN

4. De LLKT: AA is een aangepaste LLKT-methode om potentiële huidsensibiliserende chemische stoffen op te sporen, binnen specifieke beperkingen. Dit houdt niet noodzakelijkerwijs in dat de LLKT: AA in alle gevallen in plaats van de LLKT of de proef met cavia's moet worden gebruikt, (d.w.z. B.6; OESO-testrichtlijn 406) (14), maar veeleer dat de test gelijkwaardig is en als alternatief kan worden gebruikt, waarbij positieve en negatieve resultaten niet langer behoeven te worden bevestigd (10) (11). Het testlaboratorium moet vóór de uitvoering van het onderzoek alle beschikbare informatie over de teststof in overweging nemen. Die informatie zal de identiteit en de chemische structuur van de teststof bevatten; de fysisch-chemische eigenschappen ervan; de resultaten van andere in vitro of in vivo toxiciteitsproeven op de teststof; en toxicologische gegevens van chemische stoffen met een verwante structuur. Deze informatie moet in aanmerking genomen worden om te bepalen of de LLKT: AA geschikt is voor de teststof (gezien de incompatibiliteit van beperkte soorten chemische stoffen met de LLKT: AA [zie punt 5]) en om te helpen bij het bepalen van de dosis.
5. De LLKT: AA is een in-vivomethode en leidt er derhalve niet toe dat er bij de bepaling van allergische contact-sensibilisatie geen dieren meer worden gebruikt. Deze methode kan het gebruik van dieren voor dit doel verminderen in vergelijking met de proeven met cavia's (B.6; OESO-testrichtlijn 406) (14). Bovendien wordt de manier waarop de dieren gebruikt worden voor het testen van allergische contactsensibilisatie aanzienlijk verfijnd (minder pijn en leed), aangezien er bij de LLKT: AA, in tegenstelling tot de B.6 en OESO-testrichtlijn 406, geen door provocatie geïnduceerde overgevoelighedsreacties van de huid hoeven te worden opgewekt. Ondanks de voordelen van de LLKT: AA ten opzichte van B.6 en OESO-testrichtlijn 406 (14), zijn er bepaalde beperkingen waardoor het gebruik van B.6 of OESO-testrichtlijn 406 (bv. het testen van bepaalde metalen, valspositieve resultaten met bepaalde stoffen die de huid irriteren (zoals bepaalde oppervlakteactieve stoffen) (6) (1 en hoofdstuk B.42 van deze bijlage), oplosbaarheid van de teststof) nodig kan zijn. Daarnaast kan in het geval van chemische klassen of stoffen die functionele groepen bevatten waarvan is aangetoond dat ze als potentiële stoornisfactoren (16) werken, het gebruik van proeven met cavia's nodig zijn (d.w.z. B.6; OESO-testrichtlijn 406 (14)). Het is aanbevolen om de beperkingen die voor de LLKT (1, en hoofdstuk B.42 van deze bijlage) werden vastgesteld, ook toe te passen op de LLKT: AA (10). Daarnaast is het gebruik van de LLKT: AA mogelijk niet geschikt om stoffen te testen die de ATP-waarden beïnvloeden (bv. stoffen met een ATP-remmende werking) of die de correcte meting van intracellulair ATP kunnen verstoren (bv. aanwezigheid van enzymen die ATP afbreken, aanwezigheid van extracellulair ATP in de lymfklier). Buiten die vastgestelde beperkingen dient de LLKT: AA toegepast te worden voor het testen van alle stoffen, tenzij die stoffen eigenschappen hebben die de nauwkeurigheid van de LLKT: AA kunnen beïnvloeden. Bovendien moet er rekening gehouden worden met mogelijke positieve grensgevallen bij de resultaten wanneer er stimuleringsindex (SI)-waarden tussen 1,8 en 2,5 verkregen worden (zie punten 31-32). Dit is gebaseerd op de valideringsdatabank van 44 stoffen, waarbij een SI $\geq 1,8$ gehanteerd werd (zie punt 6) waarvoor de LLKT: AA alle 32 LLKT-sensibiliserende stoffen correct geïdentificeerd heeft, maar drie van de 12 niet-sensibiliserende stoffen uit de LLKT met SI-waarden tussen 1,8 en 2,5 onjuist geïdentificeerd heeft (d.w.z. positief grensgeval) (10). Aangezien dezelfde gegevensreeks gebruikt werd om de SI-waarden te bepalen en de voorspellende eigenschappen van de test te berekenen, kunnen de vermelde resultaten de werkelijke voorspellende eigenschappen echter overschatten.

PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

6. Het beginsel dat aan de LLKT: AA ten grondslag ligt, is dat sensibilisatoren induceren tot een proliferatie van lymfocyten in de lymfklieren die de afvoer verzorgen van de plaats waar de teststof wordt aangebracht. Deze proliferatie is evenredig met de dosis en de potentie van het aangebrachte allergeen en biedt een eenvoudige mogelijkheid om een kwantitatieve meting van de sensibilisering uit te voeren. De proliferatie wordt gemeten door de gemiddelde proliferatie in elke testgroep te vergelijken met de proliferatie in de met medium behandelde controlegroep (VC). De verhouding tussen de gemiddelde proliferatie in elke behandelde groep en in de overeenkomstige medium-controlegroep wordt bepaald en deze z.g. SI moet $\geq 1,8$ zijn voordat een teststof nader kan worden beoordeeld als potentiële huidsensibilisator. De hierin beschreven procedures zijn gebaseerd op een methode waarbij het ATP-gehalte gemeten wordt via bioluminescentie (waarvan geweten is dat het verband houdt met het aantal levende cellen) (17) om een verhoogd aantal prolifererende cellen in de afvoerende auriculaire lymfklieren op te sporen (18) (19). De bioluminescentiemethode maakt gebruik van het luciferase-enzym als katalysator voor het opwekken van licht uit ATP en luciferine volgens de volgende reactie:



De intensiteit van het uitgezonden licht is lineair evenredig met het ATP-gehalte en wordt gemeten met een luminometer. De luciferine-luciferasetest is een gevoelige methode om ATP te meten die gebruikt wordt voor uiteenlopende toepassingen (20).

BESCHRIJVING VAN DE TEST

Keuze van de diersoort

7. Voor deze test worden bij voorkeur muizen gebruikt. Het valideringsonderzoek voor de LLKT: AA werd uitsluitend uitgevoerd met de CBA/J-stam, die daarom beschouwd wordt als de geprefereerde stam (12) (13). Er worden jonge volwassen vrouwtjesmuizen gebruikt, die nog geen jongen hebben gehad en niet drachtig zijn. Bij het begin van het onderzoek moeten de dieren 8-twaalf weken oud zijn, het gewichtsverschil tussen de dieren moet minimaal zijn en de afwijking mag niet groter zijn dan 20 % van het gemiddelde gewicht. Er mogen ook andere stammen of mannetjes worden gebruikt, wanneer er voldoende gegevens beschikbaar zijn om aan te tonen dat er geen significante stam- en/of geslachtsspecifieke verschillen in de LLKT: AA-respons zijn.

Huisvesting en voeding

8. De muizen moeten in groepjes worden ondergebracht (21), tenzij een individuele behuizing van de muizen naar behoren wetenschappelijk wordt gemotiveerd. De temperatuur van de proefdierruimte dient $22 \pm 3^\circ\text{C}$ te zijn. De relatieve luchtvochtigheid moet ten minste 30 % zijn en (behalve tijdens het schoonmaken van de ruimte) bij voorkeur niet hoger dan 70 % zijn, maar er moet worden gestreefd naar 50-60 %. Er moet gebruik worden gemaakt van kunstlicht met een cyclus van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater.

Vorbereiding van de dieren

9. De dieren worden aselect ingedeeld, gemerkt om elk dier afzonderlijk te kunnen identificeren (maar niet door enigerlei vorm van oormerking) en vóór het begin van de toediening gedurende minimaal vijf dagen in hun kooi gehouden om ze aan de omstandigheden in het laboratorium te laten wennen. Vóór het begin van de behandeling worden alle dieren onderzocht om vast te stellen dat ze geen waarneembaar huidletsel hebben.

Bereiding van doseringsoplossingen

10. Vaste chemische stoffen moeten in oplosmiddelen/media worden opgelost of gesuspenderd en, indien nodig, verdund vóór aanbrenging op een oor van de muis. Vloeibare chemische stoffen kunnen onverdund worden toegediend of vóór de toediening worden verdund. Onoplosbare chemische stoffen, zoals die gewoonlijk voorkomen in medische apparaten, moeten worden onderworpen aan een maximale extractie in een geschikt oplosmiddel om alle extraheerbare bestanddelen voor het testen vrij te maken vóór aanbrenging op een oor van de muis. Teststoffen moeten dagelijks worden geprepareerd, tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is.

Betrouwbaarheidscontrole

11. Voor positieve controle gebruikte stoffen (PC's) worden gebruikt om aan te tonen dat de test correct werkt in de zin dat de test leidt tot een respons met voldoende en reproduceerbare gevoeligheid, waarbij de omvang van de respons goed gedocumenteerd is. Gelijktijdig gebruik van een PC wordt aanbevolen, omdat hiermee wordt aangetoond dat het laboratorium de competentie bezit om iedere test succesvol uit te voeren en omdat de intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid en -overdraagbaarheid hiermee kan worden beoordeeld. Sommige regelgevende autoriteiten vereisen ook een PC voor elk onderzoek en gebruikers worden daarom aangespoord om de relevante autoriteiten te raadplegen alvorens zij de LLKT: AA uitvoeren. Derhalve wordt het routinematige gelijktijdige gebruik van een PC aangemoedigd, zodat geen noodzaak bestaat om aanvullende dierproeven uit te voeren om te voldoen aan dergelijke vereisten die kunnen voortkomen uit het gebruik van een periodieke PC (zie punt 12). De PC moet een positieve LLKT: AA-respons opleveren bij een blootstellingsniveau waarbij in vergelijking met de negatieve controlegroep een stijging van de SI met $\geq 1,8$ wordt verwacht. De dosis van de PC moet zo worden gekozen dat de stof geen overmatige huidirritatie of systemische toxiciteit veroorzaakt en de inductie reproduceerbaar is, maar niet buitensporig (d.w.z. een SI > 10 zou buitensporig zijn). De PC die de voorkeur genieten zijn 25 % hexylcinnamaldehyde (Chemical Abstracts Service [CAS]-nummer 101-86-0) en 25 % eugenol (CAS-nummer 97-53-0,) in aceton: olijfolie (4:1, v/v). Onder bepaalde omstandigheden kunnen andere PC's worden gebruikt die aan bovengenoemde criteria voldoen, mits een afdoende motivering wordt gegeven.
12. Hoewel het gelijktijdige gebruik van een PC-groep aanbevolen wordt, kunnen er situaties zijn waarin periodieke testen (d.w.z. met intervallen $\leq$ zes maanden) van de PC toereikend kan zijn voor laboratoria die de LLKT: AA regelmatig uitvoeren (d.w.z. de LLKT-AA uitvoeren met een frequentie van niet minder dan eenmaal per maand) en die een historische PC-databank hebben die aantoont dat het laboratorium in staat is om reproduceerbare en nauwkeurige uitkomsten met PC's te verkrijgen. Toereikende ervaring met de LLKT: AA kan worden aangetoond door consequent positieve uitkomsten te genereren in ten minste tien onafhankelijke tests die binnen een redelijke tijdspanne (d.w.z. binnen één jaar) worden uitgevoerd.
13. Gelijktijdig gebruik van een PC-groep is verplicht in geval van een procedurewijziging in de LLKT: AA (bv. wijziging van gekwalificeerd personeel, wijziging in de materialen en/of reagentia van de testmethode, wijziging van de testapparatuur, wijziging van de bron van proefdieren), en dergelijke wijzigingen moeten in laboratoriumverslagen worden gedocumenteerd. Het effect van dergelijke wijzigingen op de nauwkeurigheid van de eerder opgerichte historische databank moet in overweging worden genomen om te bepalen of het nodig is een nieuwe historische databank op te richten, teneinde consistentie in de documentatie van de PC-uitkomsten te waarborgen.
14. Onderzoekers dienen zich ervan bewust te zijn dat de beslissing om een PC-onderzoek op periodieke basis uit te voeren in plaats van gelijktijdig, consequenties heeft voor de nauwkeurigheid en aanvaardbaarheid van negatieve onderzoeksuitkomsten die zijn gegenereerd zonder gelijktijdig gebruik van een PC tijdens het interval tussen opeenvolgende periodieke PC-onderzoeken. Indien bijvoorbeeld een valsnegatieve uitkomst is verkregen in het periodieke PC-onderzoek, kunnen negatieve resultaten voor teststoffen die zijn verkregen in het interval tussen het laatste aanvaardbare periodieke PC-onderzoek en het onaanvaardbare PC-onderzoek in twijfel worden getrokken. De implicaties van deze uitkomsten moeten zorgvuldig in overweging worden genomen om te bepalen of PC's gelijktijdig moeten worden gebruikt of dat alleen periodieke PC-onderzoeken moeten worden uitgevoerd. Tevens moet overwogen worden om minder dieren te gebruiken in de gelijktijdige PC-groep, indien dit wetenschappelijk gerechtvaardigd is en indien het laboratorium aantoont, op basis van laboratoriumspecifieke historische gegevens, dat minder muizen gebruikt kunnen worden (22).

15. Hoewel de PC moet worden getest in een medium waarvan bekend is dat het een consequente respons oplevert (bv. aceton: olijfolie; 4:1, v/v), kan de regelgeving in bepaalde gevallen vereisen dat de tests ook in een ongebruikelijk medium (een klinisch/chemisch relevante formulering) worden uitgevoerd (23). Indien de gelijktijdig gebruikte PC in een ander medium wordt getest dan de teststof, moet een afzonderlijke met medium behandelde groep voor de gelijktijdig gebruikte PC worden gebruikt.
16. In gevallen waarin teststoffen van een specifieke chemische klasse of bereik van responsen worden geëvalueerd, kunnen referentiestoffen ook nuttig zijn om aan te tonen dat de testmethode correct functioneert voor het signaleren van het huidsensibilisatiepotentieel van deze soorten stoffen. Geschikte referentiestoffen moeten de volgende eigenschappen hebben:
- ze moeten structureel en functioneel vergelijkbaar zijn met de klasse van de teststof die wordt getest;
 - hun fysische/chemische kenmerken moeten bekend zijn;
 - uit de LLKT afkomstige gegevens ondersteunen; AA;
 - uit andere diersmodellen en/of van mensen afkomstige gegevens ondersteunen.

UITVOERING VAN DE PROEF

Aantal dieren en hoogte van de doses

17. Er worden minimaal vier dieren per dosagroep gebruikt en ten minste drie concentraties van de teststof plus een negatieve controlegroep (NC-groep), die alleen met het medium voor de teststof wordt behandeld, en een PC (gelijktijdig of recentelijk uitgevoerd, op basis van het laboratoriumbeleid zoals beschreven in de punten 11-15). Het testen van meerdere doses van de PC moet overwogen worden, in het bijzonder wanneer de PC op periodieke basis wordt getest. Behalve dat de dieren in de controlegroepen niet met de teststof worden behandeld, worden ze verder op identieke wijze behandeld als de dieren in de behandelde groepen.
18. De keuze van de doses en het medium wordt gebaseerd op de aanbevelingen in referenties (2) en (24). Opeenvolgende doses worden doorgaans gekozen uit een geschikte concentratiereeks, zoals 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % enz. Aan de keuze van de gebruikte concentratiereeks moet een toereikende wetenschappelijke motivering ten grondslag liggen. Bij de keuze van de drie opeenvolgende concentraties moet rekening worden gehouden met alle bestaande toxicologische gegevens (bv. met betrekking tot acute toxiciteit en huidirritatie), wanneer die beschikbaar zijn, zodat bij de hoogste concentratie de blootstelling maximaal is zonder dat dit tot systemische toxiciteit en bovenmatige lokale huidirritatie leidt (24) (25). Wanneer dergelijke informatie niet beschikbaar is, kan een initiële voorafgaande screeningtest nodig zijn (zie punten 21-24).
19. Het medium mag het testresultaat niet verstoren of er invloed op uitoefenen en moet worden gekozen met het oog op de hoogste mate van oplosbaarheid, zodat de hoogst mogelijke concentratie wordt verkregen, terwijl de oplossing/suspensie geschikt moet zijn om de teststof mee aan te brengen. Aanbevolen media zijn aceton: olijfolie (4:1 v/v), N,N-dimethylformamide, methylethylketon, propyleenglycol en dimethylsulfoxide (6), maar ook een ander medium mag worden gebruikt als daarvoor een afdoende wetenschappelijke motivering wordt gegeven. In bepaalde gevallen kan het nodig zijn als extra controle een klinisch relevant oplosmiddel te gebruiken of de commerciële formulering waarin de teststof in de handel wordt gebracht. Er moet vooral voor worden gezorgd dat hydrofiele teststoffen worden opgenomen in een medium dat de huid vochtig maakt en niet onmiddellijk wegloopt. Dit kan worden bereikt door geschikte oplosbaar makende stoffen (bv. 1 % Pluronic® L92) toe te voegen. Een volledig waterig medium moet derhalve worden vermeden.
20. Door de verwerking van lymfklieren van individuele muizen kan de spreiding over de dieren worden beoordeeld en kan een statistische vergelijking tussen de teststofmetingen en de metingen voor de met medium behandelde controlegroep worden uitgevoerd (zie punt 33). Daarnaast kan door het verzamelen van gegevens met betrekking tot individuele dieren de mogelijkheid onderzocht worden om het aantal muizen in de PC-groep te verminderen (22). Verder vereisen sommige regelgevende autoriteiten het verzamelen van gegevens met betrekking tot individuele dieren. Het regelmatig vergaren van gegevens over individuele dieren brengt voordelen met zich mee op het vlak van dierenwelzijn, door dubbele tests te vermijden, die nodig zouden zijn wanneer de resultaten voor de teststoffen die aanvankelijk op een bepaalde manier verkregen werden (bv. via gepoolde gegevens over dieren) later door de regelgevende autoriteiten bekeken moeten worden volgens andere eisen (bv. gegevens over individuele dieren).

Voorafgaande screeningtest

21. Wanneer er geen gegevens beschikbaar zijn om de hoogste te testen dosis te bepalen (zie punt 18), moet een voorafgaande screeningtest worden uitgevoerd om de juiste dosis te bepalen die getest moet worden in de LLKT: AA. Het doel van de voorafgaande screeningtest is om richtsnoeren te bieden voor het kiezen van de maximale dosis in het hoofdonderzoek van de LLKT: AA, indien informatie over de concentratie die systemische toxiciteit induceert (zie punt 24) en/of bovenmatige huidirritatie (zie punt 23) niet beschikbaar is. De maximale dosis die wordt getest, moet 100 % zijn van de teststof voor vloeibare stoffen of de hoogst mogelijke concentratie voor vaste stoffen of suspensies.

22. De voorafgaande screeningtest wordt uitgevoerd onder omstandigheden die identiek zijn aan die van het hoofdonderzoek van de LLKT: AA, behalve dat er geen beoordeling is van de lymfklierproliferatie en er minder dieren per dosisgroep kunnen worden gebruikt. Aanbevolen wordt per dosisgroep een of twee dieren te gebruiken. Alle muizen worden dagelijks geobserveerd op klinische verschijnselen van systemische toxiciteit of lokale irritatie op de plaats van aanbrengen. Het lichaamsgewicht van de dieren wordt geregistreerd voorafgaand aan de test en vóór de beëindiging van de test (dag 8). Beide oren van iedere muis worden onderzocht op erytheem en de responsen worden ingeschaald met behulp van tabel 1 (25). De dikte van de oren wordt gemeten met behulp van een diktemeter (bv. een digitale micrometer of Peacock Dial-diktemeter) op dag 1 (vóór aanbrenging van de dosis), dag 3 (ongeveer 48 uur na de eerste dosis), dag 7 (24 uur voor het doden) en dag 8. Daarnaast kan op dag 8 de dikte worden bepaald door oorperforatiemetingen, die uitgevoerd moeten worden nadat de dieren op humane wijze zijn gedood. Bovenmatige huidirritatie wordt aangegeven door een erytheemscore ≥ 3 en/of een toename van de oordikte $\geq 25\%$ op een of meer van de meetdagen (26) (27). De hoogste dosis die voor het hoofdonderzoek van de LLKT: AA wordt gekozen, is de volgende lagere dosis in de concentratiereeks van de voorafgaande screeningtest (zie punt 18) die geen systemische toxiciteit en/of bovenmatige huidirritatie veroorzaakt.

Tabel 1

Erytheemscores

Waarneming	Score
Geen erytheem	0
Zeer licht erytheem (nauwelijks waarneembaar)	1
Duidelijk gedefinieerd erytheem	2
Matig tot ernstig erytheem	3
Ernstig erytheem (diep rood) tot korstvorming waardoor de inschaling van erytheem onmogelijk is	4

23. Naast een toename van de oordikte met 25% (26) (27), is een statistisch significante toename van de oordikte bij de behandelde muizen in vergelijking met de controlemuizen ook gebruikt om irriterende stoffen in de LLKT te signaleren (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Echter, hoewel statistisch significante toenames kunnen voorkomen bij een toename van de oordikte met minder dan 25% , worden ze niet specifiek met bovenmatige huidirritatie in verband gebracht (30) (31) (32) (33) (34).
24. De volgende klinische waarnemingen kunnen duiden op systemische toxiciteit (35) wanneer gebruikt als onderdeel van een geïntegreerde beoordeling en kunnen derhalve de maximale dosis aangeven die moet worden gebruikt in het hoofdonderzoek van de LLKT: AA: veranderingen in de werking van het zenuwstelsel (bv. pilo-erectie, ataxie, tremors en convulsies); veranderingen in gedrag (bv. agressiviteit, verandering in lichaamsverzorging, duidelijke verandering in het activiteitsniveau); veranderingen in ademhalingspatronen (d.w.z. veranderingen in de frequentie en intensiteit van het ademen, zoals kortademigheid, benauwdheid en gereutel) en veranderingen in de voedsel- en waterconsumptie. Daarnaast moet in de evaluatie rekening worden gehouden met tekenen van lethargie en/of gebrek aan reactiviteit alsmede klinische tekenen van meer dan lichte of voorbijgaande pijn en leed of een vermindering van het lichaamsgewicht van meer dan 5% tussen dag 1 en dag 8, evenals het sterftecijfer. Stervende dieren of dieren die duidelijk pijn hebben of tekenen van hevig en voortdurend leed vertonen, moeten op humane wijze worden gedood (36).

Proefopzet hoofdonderzoek

25. De proefopzet van het onderzoek is als volgt:

- *Dag 1:* Van elk dier apart wordt het gewicht en iedere klinische waarneming bepaald en vastgelegd. Vervolgens wordt een waterige oplossing van 1% natriumlaurylsulfaat (NLS) op het dorsum van elk oor aangebracht met een borsteltje dat in de NLS ondergedompeld wordt om het volledige dorsum van elk oor met vier tot vijf streken te bedekken. Een uur na de behandeling met NLS, wordt $25\ \mu\text{L}$ van de toepasselijke verdunning van de teststof, het medium zonder teststof of de PC (gelijktijdig of recent, in overeenstemming met het laboratoriumbeleid ten aanzien van punten 11-15) aangebracht op het dorsum van elk oor.
- *Dagen 2, 3 en 7:* Herhaal de voorafgaande behandeling met de waterige oplossing van 1% NLS en de procedure voor het aanbrengen van de teststof die op dag 1 werden toegepast.
- *Dagen 4, 5 en 6:* Geen behandeling.
- *Dag 8:* Van elk dier worden het gewicht en iedere klinische waarneming vastgelegd. Ongeveer 24 tot 30 uur na het begin van het aanbrengen op dag 7, worden de dieren op humane wijze gedood. De afvoerende auriculare lymfklieren van elke muis worden uitgeprepareerd en voor elk dier afzonderlijk behandeld in gebufferde fosfaatsaline (PBS). Referentie (22) bevat gedetailleerde informatie en diagrammen voor de identificatie en het uitprepareren van de lymfklieren. Om de lokale huidreacties in het hoofdonderzoek nader te onderzoeken, kunnen aanvullende parameters in het onderzoeksprotocol worden opgenomen, zoals de inschaling van oorerytheem of oordiktemetingen (verkregen door gebruik van een diktemeter of door oorperforatiemetingen bij de necropsie).

Bereiding van de celsuspensies

26. Van elke muis wordt er een eencellige suspensie met lymfklieren (LKC) gemaakt die aan beide zijden werden uitgeprepareerd door de lymfklieren tussen twee objectglazen te klemmen en een lichte druk uit te oefenen om de lymfklieren te pletten. Nadat bevestigd is dat het weefsel zich in een dunne laag verspreid heeft, worden de twee glaasjes van elkaar gehaald. Het weefsel op beide objectglazen wordt gesuspenseerd in PBS door elk glaasje schuin boven het petrischaaltje te houden en het te spoelen met PBS en tegelijkertijd het weefsel van het glas te schrapen met een celschraper. De lymfklieren van NC-dieren zijn bovendien klein, men moet dus voorzichtig te werk gaan om kunstmatige beïnvloeding van de SI-waarden te voorkomen. Er dient een totaal volume van 1 ml PBS gebruikt te worden voor het spoelen van beide glaasjes. De LKC-suspensie in het petrischaaltje dient enigszins gehomogeniseerd te worden met de celschraper. Vervolgens wordt een aliquot van 20 µL van de LKC-suspensie verzameld met een micropipet, waarbij ervoor gezorgd wordt dat het membraan, dat niet zichtbaar is met het blote oog, niet wordt meegenomen, waarna de suspensie gemengd wordt met 1,98 ml PBS om een monster van 2 ml te verkrijgen. Vervolgens wordt er een tweede monster van 2 ml bereid via dezelfde procedure zodat er twee monsters gemaakt worden voor elk dier.

Bepaling van celproliferatie (meten van het ATP-gehalte van de lymfocyten)

27. Toenames van het ATP-gehalte in de lymfklieren worden gemeten met de luciferine/luciferase-methode met behulp van een ATP-meetkit, die de bioluminescentie meet in relatieve lichteenheden (Relative Luminescence Units - RLU). De bepalingstijd vanaf het moment waarop het dier gedood wordt tot de meting van het ATP-gehalte voor elk individueel dier moet gelijkmatig blijven, binnen ongeveer 30 minuten, omdat het ATP-gehalte geleidelijk aan afneemt na de dood van het dier (12). De reeks procedures vanaf het uitprepareren van de auriculaire lymfklieren tot de ATP-meting dient binnen 20 minuten te worden afgerond, volgens het vooraf vastgelegde tijdschema, dat voor elk dier hetzelfde is. De ATP-luminescentie wordt gemeten voor elk monster van 2 ml, zodat in totaal twee ATP-metingen verkregen worden voor elk dier. Vervolgens wordt de gemiddelde ATP-luminescentie bepaald en gebruikt voor verdere berekeningen (zie punt 30).

WAARNEMINGEN

Klinische waarnemingen

28. Iedere muis wordt ten minste één keer per dag zorgvuldig geobserveerd op klinische verschijnselen van lokale irritatie op de plaats van aanbrengen of systemische toxiciteit. Alle waarnemingen worden systematisch geregistreerd en van elke muis wordt een apart overzicht bijgehouden. Waarnemingsschema's dienen criteria te omvatten om muizen die tekenen vertonen van systemische toxiciteit, overmatige lokale huidirritatie of huidcorrosie onmiddellijk aan te wijzen voor euthanasie (36).

Lichaamsgewicht

29. Zoals in punt 25 is vermeld, wordt aan het begin van de test en wanneer de dieren volgens schema op humane wijze worden gedood, van elk dier het lichaamsgewicht bepaald.

BEREKENING VAN RESULTATEN

30. De resultaten voor iedere behandelingsgroep worden uitgedrukt als de stimuleringsindex (SI). De SI wordt berekend door de gemiddelde RLU/muis van elke groep behandeld met teststof en de PC-groep, te delen door de gemiddelde RLU/muis voor de oplosmiddel/medium-controlegroep. De gemiddelde SI voor de VC's is dan één.
31. Binnen het beslissingsproces wordt een resultaat als positief beschouwd, indien $SI \geq 1,8$ (10). Echter, de sterkte van de dosis/respons, de statistische significantie en de consistentie van de medium-controlegroep- en PC-responsen kunnen ook worden gebruikt om te bepalen of een resultaat dat een grensgeval is (d.w.z. SI-waarde tussen 1,8 en 2,5) positief wordt verklaard (2) (3) (37).
32. Voor een net positieve respons met een SI tussen 1,8 en 2,5 kan het nuttig zijn om naast de SI-waarden ook aanvullende informatie zoals het verband tussen de dosis en de respons, bewijs voor systemische toxiciteit of overmatige irritatie, en waar nodig, statistische significantie in aanmerking te nemen om die resultaten als positief aan te merken (10). Er moet ook gekeken worden naar verschillende eigenschappen van de teststof, bijvoorbeeld of deze qua structuur verwant is met bekende huidsensibilisatoren, of de stof overmatige huidirritatie veroorzaakt bij de muis en wat de aard van het waargenomen verband tussen de dosis en de reactie is. Deze en andere overwegingen worden elders gedetailleerd besproken (4).
33. Door gegevens te verzamelen op het niveau van de individuele muis, kan een statistische analyse worden uitgevoerd voor het bestaan van een dosis/responsverhouding binnen de gegevens en de mate waarin deze verhouding voorkomt. Iedere statistische beoordeling kan een evaluatie omvatten van de dosis/responsverhouding evenals afdoende aangepaste vergelijkingen van testgroepen (bv. paarsgewijs gedoseerde groep tegenover vergelijkingen van een oplosmiddel/medium-controlegroep). Statistische analyses kunnen bijvoorbeeld lineaire regressie omvatten of de test van William voor het beoordelen van dosis/responstrends, alsmede de test van Dunnett voor paarsgewijze vergelijkingen. Bij het kiezen van een geschikte statistische analysemethode moet de onderzoeker zich bewust blijven van mogelijke variantie-heterogeniteit en andere soortgelijke problemen, die een gegevenstransformatie of een niet-parametrische statistische analyse noodzakelijk kunnen maken. In ieder geval kan het nodig zijn dat de onderzoeker SI-berekeningen en statistische analyses uitvoert met en zonder bepaalde gegevenspunten (soms „uitbijters” genoemd).

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

34. Gegevens dienen samengevat te worden in de vorm van een tabel waarin de RLU-waarden voor individuele dieren, de gemiddelde RLU/dier per groep, het bijbehorende residu (bv. SD, SEM) en de gemiddelde SI iedere dosisgroep in vergelijking met de gelijktijdig met oplossingsmiddel/medium behandelde controlegroep.

Testverslag

35. In het testverslag wordt de volgende informatie opgenomen:

Test- en controlestoffen:

- identificatiegegevens (bv. CAS-nummer en EG-nummer, indien beschikbaar; bron; zuiverheid; bekende onzuiverheden; partijnummer);
- de fysische aard en de fysisch-chemische eigenschappen (bv. de vluchtigheid, de stabiliteit en de oplosbaarheid);
- bij een mengsel de samenstelling met voor elk bestanddeel het procentuele gehalte;

Oplosmiddel/medium:

- identificatiegegevens (zuiverheid; concentratie, indien van toepassing; gebruikt volume);
- motivering van de keuze van het medium;

Proefdieren:

- bron van CBA-muizen;
- microbiologische status van de dieren, indien bekend;
- aantal en leeftijd van de dieren;
- de herkomst van de dieren, de huisvesting, de voeding enz.;

Testomstandigheden:

- de bron, het partijnummer en de gegevens van de producent over de kwaliteitsgarantie/kwaliteitscontrole voor de ATP-kit;
- gedetailleerde gegevens over de formulering en het aanbrengen van de teststof;
- motivering voor dosiskeuze (met inbegrip van resultaten van voorafgaande screeningtest, indien uitgevoerd);
- gebruikte concentraties van medium en teststof en totale hoeveelheid teststof die is aangebracht;
- gedetailleerde gegevens over de kwaliteit van het voer en het water (waaronder de aard en de herkomst van het voer en de herkomst van het water);
- gedetailleerde gegevens met betrekking tot het behandelings- en bemonsteringsschema;
- methoden voor de meting van de toxiciteit;
- criteria om te bepalen of het resultaat positief of negatief is;
- gedetailleerde gegevens met betrekking tot protocolafwijkingen en een uitleg van hoe de afwijking van invloed is op de opzet en resultaten van het onderzoek;

Betrouwbaarheidscontrole:

- overzicht van de resultaten van de meest recente betrouwbaarheidscontrole met informatie over de teststof, de concentratie en het gebruikte medium;

- tegelijkertijd en/of in het verleden bepaalde positieve en tegelijkertijd bepaalde negatieve (oplosmiddel/medium) controlegegevens voor het testlaboratorium;
- indien geen gelijktijdige PC is uitgevoerd, de datum en het laboratoriumverslag voor de meest recente periodieke PC en een verslag met de historische PC-gegevens voor het laboratorium waarin de beslissing om geen gelijktijdige PC uit te voeren, wordt gemotiveerd;

Resultaten:

- het gewicht van elke muis aan het begin van de test en wanneer deze volgens schema wordt gedood; evenals het gemiddelde bijbehorende residu (bv. SD, SEM) voor iedere behandelingsgroep;
- voor elk dier het tijdstip waarop de eventuele toxiciteitsverschijnselen zich voordoen, met inbegrip van huidirritatie op de toedieningsplaats, en het verloop daarvan;
- voor elk dier het tijdstip waarop het gedood werd en het tijdstip waarop de ATP-meting werd uitgevoerd;
- een tabel met de RLU-waarden voor elke muis en de SI-waarden voor elke doseringsgroep;
- gemiddeld bijbehorend residu (bv. SD, SEM) voor de RLU/muis voor elke behandelingsgroep en de resultaten van uitbijteranalyses voor elke behandelingsgroep;
- berekende SI en een geschikte meting van de variabiliteit die rekening houdt met de spreiding over de dieren in zowel de teststof- als de controlegroepen;
- dosis/responsverhouding;
- statistische analyses, indien van toepassing;

Bespreking van de resultaten:

- Een korte bespreking van de resultaten, de dosis/respons-analyse en de statistische analyses, indien van toepassing, met een conclusie ten aanzien van de vraag of de teststof als huidsensibilisator moet worden beschouwd.

LITERATUUR

- (1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 999-1002.
- (3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 985-997.
- (4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-333.
- (5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.
- (6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [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. Available at: [<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. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRRept2009.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. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- (16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- (17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.*, 160, 81-88.
- (18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth.*, 72, 127-132.
- (19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27-34.
- (20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol.*, 305, 346-370.
- (21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Available at: [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. Available at: [<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. Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>].
- (28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- (31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- (32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.
- (33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [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. Available at: [<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. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Nauwkeurigheid: de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de testmethode en erkende referentiewaarden. Het is een maat voor de prestaties van de testmethode en één aspect van relevantie. Deze term en de term „concordantie”, waaronder het percentage correcte uitkomsten van een testmethode wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt (38).

Ijkstof: een sensibiliserende of niet-sensibiliserende stof die gebruikt wordt als norm voor vergelijking met een teststof. Een ijkstof moet de volgende eigenschappen hebben: (i) consistente en betrouwbare bron(nen); (ii) in structureel en functioneel opzicht soortgelijk aan de geteste klasse stoffen; (iii) bekende fysisch-chemische eigenschappen; (iv) ondersteunende gegevens met betrekking tot bekende effecten, en (v) bekende potentie binnen het bereik van de gewenste respons.

Valsnegatief: een teststof die door een testmethode ten onrechte als negatief of niet-actief wordt geïdentificeerd, terwijl de stof feitelijk positief of actief is.

Valspositief: een teststof die ten onrechte als positief of actief wordt geïdentificeerd, terwijl de stof in feite negatief of niet-actief is.

Gevaar: het risico van een nadelig effect op de gezondheid of het milieu. Het nadelige effect doet zich alleen voor indien er voldoende blootstelling is.

Interlaboratoriumreproduceerbaarheid: een maatstaf voor de mate waarin verschillende gekwalificeerde laboratoria die gebruikmaken van hetzelfde protocol en die dezelfde teststoffen testen, in kwalitatief en kwantitatief opzicht vergelijkbare resultaten kunnen produceren. De interlaboratoriumreproduceerbaarheid wordt bepaald tijdens de prevaliderings- en valideringsprocessen en geeft aan in hoeverre een test met succes tussen laboratoria kan worden overgedragen; dit wordt ook wel reproduceerbaarheid tussen laboratoria genoemd (38).

Intralaboratoriumreproduceerbaarheid: een bepaling van de mate waarin gekwalificeerde mensen binnen hetzelfde laboratorium met succes resultaten kunnen repliceren met gebruikmaking van een specifiek protocol op verschillende tijdstippen. Dit wordt ook reproduceerbaarheid binnen laboratoria genoemd (38).

Uitbijter: een uitbijter is een waarneming die duidelijk afwijkt van andere waarden binnen een willekeurige steekproef uit een populatie.

Kwaliteitsborging: een beheerproces waarbij de naleving van de testnormen, eisen en boekhoudingsprocedures voor laboratoria alsmede de nauwkeurigheid van de gegevensoverdracht worden beoordeeld door personen die onafhankelijk zijn van degenen die de tests uitvoeren.

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een testmethode, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden toegepast. De betrouwbaarheid wordt beoordeeld door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid (38).

Huidsensibilisatie: een immunologisch proces dat ontstaat wanneer een vatbare persoon of proefdier plaatselijk wordt blootgesteld aan een inducerend chemisch allergeen, dat een immunologische huidreactie veroorzaakt die kan leiden tot de ontwikkeling van contactsensibilisatie.

Stimuleringsindex (SI): een waarde die wordt berekend om het huidsensibilisatiepotentieel van een teststof te beoordelen en die gelijk is aan de verhouding van de proliferatie bij behandelde groepen ten opzichte van de proliferatie bij de gelijktijdig met medium behandelde controlegroep.

Teststof: iedere stof of ieder mengsel die/dat met deze TM wordt getest.

B.51. HUIDSENSIBILISATIE: LOKALE LYMFKLIERTEST: BrdU-ELISA

INLEIDING

1. De OESO-richtlijnen inzake het testen van chemische stoffen (Guidelines for the Testing of Chemicals) en de daarop gebaseerde EU-testmethoden worden regelmatig herzien in het licht van de wetenschappelijke vooruitgang, zich wijzigende behoeften aan regelgeving en overwegingen met het oog op dierenwelzijn. De eerste testmethode (TM) (B.42) voor het bepalen van de huidsensibilisatie bij muizen, de lokale lymfkliertest (LLKT; OESO-testrichtlijn 429) is herzien (1, en hoofdstuk B.42 van deze bijlage). Er zijn publicaties verschenen met de gegevens over de validatie van de LLKT en een overzicht van gerelateerd onderzoek (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). In de LLKT wordt radio-isotoop thymidine of jodium gebruikt om de proliferatie van de lymfocyten te meten en de test is daarom slechts beperkt bruikbaar indien de aankoop, het gebruik en de verwijdering van radioactief materiaal problematisch zijn. De LLKT: BrdU-ELISA [enzyme-linked immunosorbent assay] is een niet-radioactieve aanpassing van de LLKT TM, waarbij gebruikgemaakt wordt van niet radioactief gemerkt 5-broom-2-deoxyuridine (BrdU) (Chemical Abstracts Service [CAS] nr. 59-14-3) in een op ELISA gebaseerd testsysteem om de proliferatie van lymfocyten te meten. De LLKT: BrdU-ELISA werd door een onafhankelijk internationaal panel voor collegiale toetsing gevalideerd, beoordeeld en aanbevolen als nuttig instrument om huidsensibiliserende en niet-huidsensibiliserende chemische stoffen op te sporen, binnen bepaalde beperkingen (10) (11) (12). Deze TM werd ontworpen om de potentiële huidsensibilisatie door chemische stoffen (stoffen en mengsels) bij dieren te bepalen. In hoofdstuk B.6 van deze bijlage en in OESO-testrichtlijn 406 worden proeven met cavia's gebruikt: de maximalisatietest en de Buehlertest (13). De LLKT (hoofdstuk B.42 van deze bijlage; OESO-testrichtlijn 429) en de twee niet-radioactieve aanpassingen, LLKT: BrdU-ELISA (hoofdstuk B.51 van deze bijlage; OESO-testrichtlijn 442 B) en LLKT: AA (hoofdstuk B.50 van deze bijlage; OESO-testrichtlijn 442 A), bieden allemaal een voordeel ten opzichte van de proeven met cavia's in B.6 en OESO-testrichtlijn 406 (13) ten aanzien van een beperking en verfijning van het gebruik van dieren.

2. NET zoals de LLKT, bestudeert de LLKT: BrdU-ELISA de inductiefase van huidsensibilisatie en levert kwantitatieve gegevens die voor een dosis/responsbepaling kunnen worden gebruikt. Bovendien neemt de mogelijkheid om huidsensibiliserende stoffen op te sporen zonder gebruik te maken van isotopenmerking voor DNA het risico op beroepsmatige blootstelling aan radioactiviteit en de problemen met afvalverwijdering weg. Dat maakt het dan weer mogelijk om vaker muizen te gebruiken om huidsensibiliserende stoffen op te sporen, waardoor het gebruik van cavia's in onderzoek naar huidsensibilisatie mogelijk beperkt kan worden (d.w.z. B.6; OESO-testrichtlijn 406) (13).

DEFINITIES

3. Gebruikte definities worden gegeven in aanhangsel 1.

TOELICHTING EN BEPERKINGEN

4. De LLKT: BrdU-ELISA is een aangepaste LLKT-methode om potentiële huidsensibiliserende chemische stoffen op te sporen, binnen specifieke beperkingen. Dit houdt niet noodzakelijkerwijs in dat de LLKT: BrdU-ELISA in alle gevallen in plaats van de LLKT of de proef met cavia's moet worden gebruikt, (d.w.z. B.6; OESO-testrichtlijn 406) (13), maar veeleer dat de test gelijkwaardig is en als alternatief kan worden gebruikt, waarbij positieve en negatieve resultaten niet langer behoeven te worden bevestigd (10) (11). Het testlaboratorium moet vóór de uitvoering van het onderzoek alle beschikbare informatie over de teststof in overweging nemen. Die informatie zal de identiteit en de chemische structuur van de teststof bevatten; de fysisch-chemische eigenschappen ervan; de resultaten van andere in-vitro- of in-vivotoxiciteitsproeven op de teststof; en toxicologische gegevens van chemische stoffen met een verwante structuur. Deze informatie moet in aanmerking genomen worden om te bepalen of de LLKT: BrdU-ELISA geschikt is voor de teststof (gezien de incompatibiliteit van beperkte soorten chemische stoffen met de LLKT: BrdU-ELISA (zie punt 5)) en om te helpen bij het bepalen van de dosis.
5. De LLKT: BrdU-ELISA is een in-vivomethode en leidt er derhalve niet toe dat er bij de bepaling van allergische contactsensibilisatie geen dieren meer worden gebruikt. Deze methode kan het gebruik van dieren voor dit doel verminderen in vergelijking met de proeven met cavia's (B.6; OESO-testrichtlijn 406) (13). Bovendien zorgt de LLKT: BrdU-ELISA voor een aanzienlijke verfijning van de manier waarop dieren voor het testen op contactsensibilisatie worden gebruikt, aangezien er bij de LLKT: BrdU-ELISA, in tegenstelling tot de B.6 en OESO-testrichtlijn 406, geen door provocatie geïnduceerde overgevoelighedsreacties van de huid hoeven te worden opgewekt. Bovendien heeft bij de LLKT: BrdU-ELISA geen adjuvans te worden gebruikt, hetgeen bij de maximalisatietest bij cavia's wel nodig is (hoofdstuk B.6 van deze bijlage, 13). Dit betekent dat de LLKT: BrdU-ELISA het ongerief voor dieren beperkt. Ondanks de voordelen van de LLKT: BrdU-ELISA ten opzichte van B.6 en OESO-testrichtlijn 406 (13), zijn er bepaalde beperkingen waardoor het gebruik van B.6 of OESO-testrichtlijn 406 (bv. het testen van bepaalde metalen, valspositieve resultaten met bepaalde stoffen die de huid irriteren (zoals bepaalde oppervlakteactieve stoffen) (6) (1 en hoofdstuk B.42 van deze bijlage), oplosbaarheid van de teststof) nodig kan zijn. Daarnaast kan in het geval van chemische klassen of stoffen die functionele groepen bevatten waarvan is aangetoond dat ze als potentiële stoorfactoren (15) werken, het gebruik van proeven met cavia's (d.w.z. B.6; OESO-testrichtlijn 406 (13)) nodig zijn. Aanbevolen wordt om de beperkingen die voor de LLKT (1, en hoofdstuk B.42 van deze bijlage) werden vastgesteld, ook toe te passen op de LLKT: BrdU-ELISA (10). Buiten die vastgestelde beperkingen, dient de LLKT: BrdU-ELISA toegepast te worden voor het testen van alle stoffen, tenzij die stoffen eigenschappen hebben die de nauwkeurigheid van de LLKT: BrdU-ELISA kunnen beïnvloeden. Bovendien moet er rekening gehouden worden met mogelijke positieve grensgevallen in de resultaten wanneer er stimuleringsindex (SI)-waarden tussen 1,6 en 1,9 verkregen worden (zie punten 31-32). Dit is gebaseerd op de valideringsdatabank van 43 stoffen, waarbij een SI $\geq 1,6$ gehanteerd werd (zie punt 6) waarvoor de LLKT: BrdU-ELISA alle 32 LLKT-sensibiliserende stoffen correct geïdentificeerd heeft, maar twee van de 11 niet-sensibiliserende stoffen uit de LLKT met SI-waarden tussen 1,6 en 1,9 onjuist geïdentificeerd heeft (d.w.z. positief grensgeval) (10). Aangezien dezelfde gegevensreeks gebruikt werd om de SI-waarden te bepalen en de voorspellende eigenschappen van de test te berekenen, kunnen de vermelde resultaten de werkelijke voorspellende eigenschappen echter overschatten.

PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

6. Het beginsel dat aan de LLKT: BrdU-ELISA ten grondslag ligt, is dat sensibilisatoren induceren tot een proliferatie van lymfocyten in de lymfklier die de afvoer verzorgt van de plaats waar de teststof wordt aangebracht. Deze proliferatie is evenredig met de dosis en de potentie van het aangebrachte allergeen en biedt een eenvoudige mogelijkheid om een kwantitatieve meting van de sensibilisering uit te voeren. De proliferatie wordt gemeten door de gemiddelde proliferatie in elke testgroep te vergelijken met de proliferatie in de met medium behandelde controlegroep (VC). De verhouding tussen de gemiddelde proliferatie in elke behandelde groep en in de overeenkomstige medium-controlegroep wordt bepaald en deze z.g. SI moet $\geq 1,6$ zijn voordat een teststof nader kan worden beoordeeld als potentiële huidsensibilisator. De hierin beschreven procedures zijn gebaseerd op een methode waarbij het BrdU-gehalte gemeten wordt om een verhoogd aantal prolifererende cellen in de afvoerende auriculaire lymfklieren op te sporen. BrdU is een analogon van thymidine en wordt op een vergelijkbare manier opgenomen in het DNA van prolifererende cellen. De opname van BrdU wordt gemeten door ELISA, dat gebruikmaakt van een specifiek antilichaam voor BrdU dat ook gemerkt wordt met peroxidase. Wanneer de stof wordt toegevoegd, reageert de peroxidase met het substraat en vormt het zo een gekleurd product dat gekwantificeerd wordt bij een specifieke absorptie met behulp van een microtiterplaatlezer.

BESCHRIJVING VAN DE TEST

Keuze van de diersoort

7. Voor deze test worden bij voorkeur muizen gebruikt. Het valideringsonderzoek voor de LLKT: BrdU-ELISA werd uitsluitend uitgevoerd met de CBA/JN-stam, die daarom beschouwd wordt als de geprefereerde stam (10) (12). Er worden jonge volwassen vrouwtjesmuizen gebruikt, die nog geen jongen hebben gehad en niet drachtig zijn. Bij het begin van het onderzoek moeten de dieren 8-twaalf weken oud zijn, het gewichtsverschil tussen de dieren moet minimaal zijn en de afwijking mag niet groter zijn dan 20 % van het gemiddelde gewicht. Er mogen ook andere stammen of mannetjes worden gebruikt, wanneer er voldoende gegevens beschikbaar zijn om aan te tonen dat er geen significante stam- en/of geslachtsspecifieke verschillen in de LLKT: BrdU-ELISA-respons bestaan.

Huisvesting en voeding

8. De muizen moeten in groepjes worden ondergebracht (16), tenzij een individuele behuizing van de muizen naar behoren wetenschappelijk wordt gemotiveerd. De temperatuur van de proefdierruimte dient $22 \pm 3^\circ\text{C}$ te zijn. De relatieve luchtvochtigheid moet ten minste 30 % zijn en (behalve tijdens het schoonmaken van de ruimte) bij voorkeur niet hoger dan 70 % zijn, maar er moet worden gestreefd naar 50-60 %. Er moet gebruik worden gemaakt van kunstlicht met een cyclus van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater.

Vorbereiding van de dieren

9. De dieren worden aseptic ingedeeld, gemerkt om elk dier afzonderlijk te kunnen identificeren (maar niet door enigerlei vorm van oormerking) en vóór het begin van de toediening gedurende minimaal vijf dagen in hun kooi gehouden om ze aan de omstandigheden in het laboratorium te laten wennen. Vóór het begin van de behandeling worden alle dieren onderzocht om vast te stellen dat ze geen waarneembaar huidletsel hebben.

Bereiding van doseringsoplossingen

10. Vaste chemische stoffen moeten in oplosmiddelen/media worden opgelost of gesuspenderd en, indien nodig, verdund vóór aanbrenging op een oor van de muis. Vloeibare chemische stoffen kunnen onverdund worden toegediend of vóór de toediening worden verdund. Onoplosbare chemische stoffen, zoals die gewoonlijk voorkomen in medische apparaten, moeten worden onderworpen aan een maximale extractie in een geschikt oplosmiddel om alle extraheerbare bestanddelen voor het testen vrij te maken vóór aanbrenging op een oor van de muis. Teststoffen moeten dagelijks worden geprepareerd, tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is.

Betrouwbaarheidscontrole

11. Voor positieve controle gebruikte stoffen (PC's) worden gebruikt om aan te tonen dat de test correct werkt in de zin dat de test leidt tot een respons met voldoende en reproduceerbare gevoeligheid, waarbij de omvang van de respons goed gedocumenteerd is. Gelijktijdig gebruik van een PC wordt aanbevolen, omdat hiermee wordt aangetoond dat het laboratorium de competentie bezit om iedere test succesvol uit te voeren en omdat de intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid en -overdraagbaarheid hiermee kan worden beoordeeld. Sommige regelgevende autoriteiten vereisen ook een PC voor elk onderzoek en gebruikers worden daarom aangespoord om de relevante autoriteiten te raadplegen alvorens zij de LLKT: BrdU-ELISA uitvoeren. Derhalve wordt het routinematige gelijktijdige gebruik van een PC aangemoedigd, zodat geen noodzaak bestaat om aanvullende dieproeven uit te voeren om te voldoen aan dergelijke vereisten die kunnen voortkomen uit het gebruik van een periodieke PC (zie punt 12). De PC moet een positieve LLKT: BrdU-ELISA-respons opleveren bij een blootstellingsniveau waarbij in vergelijking met de negatieve controlegroep (NC) een stijging van de stimuleringsindex (SI) met $\geq 1,6$ wordt verwacht. De dosis van de PC moet zo worden gekozen dat de stof geen overmatige huidirritatie of systemische toxiciteit veroorzaakt en de inductie reproduceerbaar is, maar niet buitensporig (bv. een SI > 14 zou buitensporig zijn). 25 % hexylcinnamaldehyde (CAS-nr. 101-86-0) en 25 % eugenol (CAS-nr. 97-53-0) in aceton: olijfolie (4:1, v/v) verdienen de voorkeur als PC. Onder bepaalde omstandigheden kunnen andere PC's worden gebruikt die aan bovengenoemde criteria voldoen, mits een afdoende motivering wordt gegeven.
12. Hoewel het gelijktijdige gebruik van een PC-groep aanbevolen wordt, kunnen er situaties zijn waarin periodiek testen (d.w.z. met intervallen $\leq$ zes maanden) van de PC toereikend kan zijn voor laboratoria die de LLKT: BrdU-ELISA regelmatig uitvoeren (d.w.z. de LLKT: BrdU-ELISA uitvoeren met een frequentie van niet minder dan eenmaal per maand) en die een historische PC-databank hebben die aantoonde dat het laboratorium in staat is om reproduceerbare en nauwkeurige uitkomsten met PC's te verkrijgen. Toereikende ervaring met de LLKT: BrdU-ELISA kan worden aangetoond door consequent positieve uitkomsten te genereren in ten minste tien onafhankelijke tests die binnen een redelijke tijdspanne (d.w.z. binnen één jaar) worden uitgevoerd.
13. Gelijktijdig gebruik van een PC-groep is verplicht in geval van een procedurewijziging van de LLKT: BrdU-ELISA gewijzigd wordt (bv. wijziging van gekwalificeerd personeel, wijziging in de materialen en/of reagentia van de testmethode, wijziging van de testapparatuur, wijziging van de bron van proefdieren), en dergelijke wijzigingen moeten in laboratoriumverslagen worden gedocumenteerd. Het effect van dergelijke wijzigingen op de nauwkeurigheid van de eerder opgerichte historische databank moet in overweging worden genomen om te bepalen of het nodig is een nieuwe historische databank op te richten, teneinde consistentie in de documentatie van de PC-uitkomsten te waarborgen.

14. Onderzoekers dienen zich ervan bewust te zijn dat de beslissing om een PC-onderzoek op periodieke basis uit te voeren in plaats van gelijktijdig, consequenties heeft voor de nauwkeurigheid en aanvaardbaarheid van negatieve onderzoeksuitkomsten die zijn gegenereerd zonder gelijktijdig gebruik van een PC tijdens het interval tussen opeenvolgende periodieke PC-onderzoeken. Indien bijvoorbeeld een valsnegatieve uitkomst is verkregen in het periodieke PC-onderzoek, kunnen negatieve resultaten voor teststoffen die zijn verkregen in het interval tussen het laatste aanvaardbare periodieke PC-onderzoek en het onaanvaardbare PC-onderzoek in twijfel worden getrokken. De implicaties van deze uitkomsten moeten zorgvuldig in overweging worden genomen om te bepalen of PC's gelijktijdig moeten worden gebruikt of dat alleen periodieke PC-onderzoeken moeten worden uitgevoerd. Tevens moet overwogen worden om minder dieren te gebruiken in de gelijktijdige PC-groep, indien dit wetenschappelijk gerechtvaardigd is en indien het laboratorium aantoonbaar, op basis van laboratoriumspecifieke historische gegevens, dat minder muizen gebruikt kunnen worden (17).
15. Hoewel de PC moet worden getest in een medium waarvan bekend is dat het een consequente respons oplevert (bv. aceton: olijfolie; 4:1, v/v), kan de regelgeving in bepaalde gevallen vereisen dat de tests ook in een ongebruikelijk medium (een klinisch/chemisch relevante formulering) worden uitgevoerd (18). Indien de gelijktijdig gebruikte PC in een ander medium wordt getest dan de teststof, moet een afzonderlijke met medium behandelde groep voor de gelijktijdig gebruikte PC worden gebruikt.
16. In gevallen waarin teststoffen van een specifieke chemische klasse of bereik van responsen worden geëvalueerd, kunnen referentiestoffen ook nuttig zijn om aan te tonen dat de testmethode correct functioneert voor het signaleren van het huidsensibilisatiepotentieel van deze soorten stoffen. Geschikte referentiestoffen moeten de volgende eigenschappen hebben:
- ze moeten structureel en functioneel vergelijkbaar zijn met de klasse van de teststof die wordt getest;
 - hun fysische/chemische kenmerken moeten bekend zijn;
 - ondersteunende gegevens uit de LLKT: BrdU-ELISA;
 - uit andere diersoorten en/of van mensen afkomstige gegevens ondersteunen.

UITVOERING VAN DE PROEF

Aantal dieren en hoogte van de doses

17. Er worden minimaal vier dieren per dosagroep gebruikt en ten minste drie concentraties van de teststof plus een parallelle NC-groep, die alleen met het medium voor de teststof wordt behandeld, en een PC-groep (gelijktijdig of recent, volgens het laboratoriumbeleid ten aanzien van punten 11-15). Het testen van meerdere doses van de PC moet overwogen worden, in het bijzonder wanneer de PC op periodieke basis wordt getest. Behalve dat de dieren in de controlegroepen niet met de teststof worden behandeld, worden ze verder op identieke wijze behandeld als de dieren in de behandelde groepen.
18. De keuze van de doses en het medium wordt gebaseerd op de aanbevelingen in referenties 2 en 19. Opeenvolgende doses worden doorgaans gekozen uit een geschikte concentratiereeks, zoals 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % enz. Aan de keuze van de gebruikte concentratiereeks moet een toereikende wetenschappelijke motivering ten grondslag liggen. Bij de keuze van de drie opeenvolgende concentraties moet er rekening gehouden worden met alle bestaande toxicologische gegevens (bv. over de acute toxiciteit en huidirritatie) en structurele en fysiochemische gegevens over de desbetreffende teststof, wanneer die beschikbaar zijn, zodat bij de hoogste concentratie de blootstelling maximaal is zonder dat dit tot systemische toxiciteit en/of overmatige lokale huidirritatie leidt (19)(20 en hoofdstuk B.4 van deze bijlage). Wanneer dergelijke informatie niet beschikbaar is, kan een initiële voorafgaande screeningtest nodig zijn (zie punten 21-24).
19. Het medium mag het testresultaat niet verstoren of er invloed op uitoefenen en moet worden gekozen met het oog op de hoogste mate van oplosbaarheid, zodat de hoogst mogelijke concentratie wordt verkregen, terwijl de oplossing/suspensie geschikt moet zijn om de teststof mee aan te brengen. Aanbevolen media zijn aceton: olijfolie (4:1 v/v), N,N-dimethylformamide, methylethylketon, propyleenglycol en dimethylsulfoxide (6), maar ook een ander medium mag worden gebruikt als daarvoor een afdoende wetenschappelijke motivering wordt gegeven. In bepaalde gevallen kan het nodig zijn als extra controle een klinisch relevant oplosmiddel te gebruiken of de commerciële formulering waarin de teststof in de handel wordt gebracht. Er moet vooral voor worden gezorgd dat er hydrofiele stoffen worden opgenomen in een medium dat de huid vochtig maakt en niet onmiddellijk wegloopt, door geschikte oplosmiddelen op te nemen (bv. 1 % Pluronic® L92). Een volledig waterig medium moet derhalve worden vermeden.
20. Door de verwerking van lymfklieren van individuele muizen kan de spreiding over de dieren worden beoordeeld en kan een statistische vergelijking tussen de teststofmetingen en de metingen voor de met medium behandelde controlegroep worden uitgevoerd (zie punt 33). Daarnaast kan door het verzamelen van gegevens met betrekking tot individuele dieren de mogelijkheid onderzocht worden om het aantal muizen in de PC-groep te verminderen (17). Verder vereisen sommige regelgevende autoriteiten het verzamelen van gegevens met betrekking tot individuele dieren. Het regelmatig vergaren van gegevens over individuele dieren brengt voordelen met zich mee op het vlak van dierenwelzijn, door dubbele tests te vermijden, die nodig zouden zijn wanneer de resultaten voor de teststoffen die aanvankelijk op een bepaalde manier verkregen werden (bv. via gepoolde gegevens over dieren) later door de regelgevende autoriteiten bekeken moeten worden volgens andere eisen (bv. gegevens over individuele dieren).

Voorafgaande screeningtest

21. Wanneer er geen gegevens beschikbaar zijn om de hoogste te testen dosis te bepalen (zie punt 18), moet een voorafgaande screeningtest worden uitgevoerd om de juiste dosis te bepalen die in de LLKT: BrdU-ELISA getest moet worden. Het doel van de voorafgaande screeningtest is om richtsnoeren te bieden voor het kiezen van de maximale dosis in het hoofdonderzoek van de LLKT: BrdU-ELISA, indien informatie over de concentratie die systemische toxiciteit induceert (zie punt 24) en/of bovenmatige lokale huidirritatie (zie punt 23) niet beschikbaar is. De maximale dosis die wordt getest, moet 100 % zijn van de teststof voor vloeibare stoffen of de hoogst mogelijke concentratie voor vaste stoffen of suspensies.
22. De voorafgaande screeningtest wordt uitgevoerd onder omstandigheden die identiek zijn aan die van het hoofdonderzoek van de LLKT: BrdU-ELISA, behalve dat er geen beoordeling is van de lymfklierproliferatie en er minder dieren per dosisgroep kunnen worden gebruikt. Aanbevolen wordt per dosisgroep een of twee dieren te gebruiken. Alle muizen worden dagelijks geobserveerd op klinische verschijnselen van systemische toxiciteit of lokale irritatie op de plaats van aanbrengen. Het lichaamsgewicht van de dieren wordt geregistreerd voorafgaand aan de test en vóór de beëindiging van de test (dag 6). Beide oren van iedere muis worden onderzocht op erytheem en de responsen worden ingeschaald met behulp van tabel 1 (20, en hoofdstuk B.4 van deze bijlage). De dikte van de oren wordt gemeten met behulp van een diktemeter (bv. een digitale micrometer of Peacock Dial-diktemeter) op dag 1 (vóór aanbrenging van de dosis), dag 3 (ongeveer 48 uur na de eerste dosis) en dag 6. Daarnaast kan op dag 6 de dikte worden bepaald door oorperforatiemetingen, die uitgevoerd moeten worden nadat de dieren op humane wijze zijn gedood. Bovenmatige huidirritatie wordt aangegeven door een erytheemscore ≥ 3 en/of een toename van de oordikte ≥ 25 % op een of meer van de meetdagen (21) (22). De hoogste dosis die voor het hoofdonderzoek van de LLKT wordt gekozen, is de volgende lagere dosis in de concentratiereeks van de voorafgaande screeningtest (zie punt 18) die geen systemische toxiciteit en/of bovenmatige huidirritatie veroorzaakt.

Tabel 1

Erytheemscores

Waarneming	Score
Geen erytheem	0
Zeer licht erytheem (nauwelijks waarneembaar)	1
Duidelijk gedefinieerd erytheem	2
Matig tot ernstig erytheem	3
Ernstig erytheem (diep rood) tot korstvorming waardoor de inschaling van erytheem onmogelijk is	4

23. Naast een toename van de oordikte met 25 % (21) (22), is een statistisch significante toename van de oordikte bij de behandelde muizen in vergelijking met de controlemuizen ook gebruikt om irriterende stoffen in de LLKT te signaleren (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Echter, hoewel statistisch significante toenames kunnen voorkomen bij een toename van de oordikte met minder dan 25 %, worden ze niet specifiek met bovenmatige huidirritatie in verband gebracht (25) (26) (27) (28) (29).
24. De volgende klinische waarnemingen kunnen duiden op systemische toxiciteit (30) wanneer gebruikt als onderdeel van een geïntegreerde beoordeling en kunnen derhalve de maximale dosis aangeven die in het hoofdonderzoek van de LLKT moet worden gebruikt: BrdU-ELISA: veranderingen in de werking van het zenuwstelsel (bv. pilo-erectie, ataxie, tremors en convulsies); veranderingen in gedrag (bv. agressiviteit, verandering in lichaamsverzorging, duidelijke verandering in het activiteitsniveau); veranderingen in ademhalingspatronen (d.w.z. veranderingen in de frequentie en intensiteit van het ademen, zoals kortademigheid, benauwdheid en gereutel) en veranderingen in de voedsel- en waterconsumptie. Daarnaast moet in de evaluatie rekening worden gehouden met tekenen van lethargie en/of gebrek aan reactiviteit alsmede klinische tekenen van meer dan lichte of voorbijgaande pijn en leed of een vermindering van het lichaamsgewicht van meer dan 5 % tussen dag 1 en dag 6, evenals het sterftecijfer. Stervende dieren of dieren die duidelijk pijn hebben of tekenen van hevig en voortdurend leed vertonen, moeten op humane wijze worden gedood (31).

Proefopzet hoofdonderzoek

25. De proefopzet van het onderzoek is als volgt:
- *Dag 1:* Van elk dier apart wordt het gewicht en iedere klinische waarneming bepaald en vastgelegd. Er wordt 25 µL van de toepasselijke verdunning van de teststof, het medium zonder teststof of de PC (gelijktijdig of recent, in overeenstemming met het laboratoriumbeleid ten aanzien van punten 11-15) aangebracht op het dorsum van elk oor.
 - *Dagen 2 en 3:* Herhaal de aanbrengprocedure van dag 1.
 - *Dag 4:* Geen behandeling.
 - *Dag 5:* Injecteer intra-peritoneaal 0,5 ml (5 mg/muis) BrdU-oplossing (10 mg/ml).

- Dag 6: Van elk dier worden het gewicht en iedere klinische waarneming vastgelegd. Ongeveer 24 uur (24 u) na de BrdU-injectie, worden de dieren op humane wijze gedood. De afvoerende auriculaire lymfklieren van elke muis worden uitgeprepareerd en voor elk dier afzonderlijk behandeld in gebufferde fosfaatsaline (PBS). Referentie (17) bevat gedetailleerde informatie en diagrammen voor de identificatie en het uitprepareren van de lymfklieren. Om de lokale respons van de huid verder te controleren in het hoofdonderzoek, kunnen aanvullende parameters, zoals het inschalen van oorerithemen of de metingen van de oordikte (verkregen met behulp van een diktemeter of een gewichtbepaling met een oorgatentang bij de necropsie) opgenomen worden in het onderzoeksprotocol.

Bereiding van de celsuspensies

26. Er wordt voor elke muis een eencellige suspensie met lymfklieren (LKC) gemaakt die aan beide zijden werden uitgeprepareerd door de lymfklieren door het weefsel voorzichtig door een roestvrij stalen gaas met een maaswijdte van 200 µm te persen of gebruik te maken van een andere aanvaardbare techniek voor het maken van een eencellige suspensie (bv. gebruik van een plastic wegwerpstamper om de lymfklieren te pletten en ze daarna door een #70 nylon gaas te persen). De procedure voor het maken van de LKC-suspensie is van essentieel belang in deze test en elke operator moet deze vaardigheid daarom op voorhand verwerven. De lymfklieren van NC-dieren zijn bovendien klein, men moet dus voorzichtig te werk gaan om kunstmatige beïnvloeding van de SI-waarden te voorkomen. Het doelvolumen van de LKC-suspensie moet in elk geval aangepast worden aan een vastgelegd geoptimaliseerd volume (ongeveer 15 ml). Het geoptimaliseerde volume is gestoeld op het bereiken van een gemiddelde absorptie bij de NC-groep tussen 0,1 - 0,2.

Bepaling van celproliferatie (meting van het BrdU-gehalte in het DNA van lymfocyten)

27. BrdU wordt gemeten via ELISA met behulp van een in de handel verkrijgbare kit (bv. Roche Applied Science, Mannheim, Germany, Catalogusnummer 11 647 229 001). 100 µL van de LKC-suspensie wordt snel in drievoud toegevoegd aan de putjes van een microtiterplaat met een vlakke bodem. Na de fixatie en denaturatie van de LKC worden anti-BrdU-antilichamen toegevoegd aan elk putje en wordt de reactie afgewacht. Vervolgens wordt het anti-BrdU-antilichaam verwijderd door spoeling, waarna de substraatoplossing wordt toegevoegd en er chromogeen geproduceerd wordt. Dan wordt de absorptie op 370 nm met een referentiegolflengte van 492 nm gemeten. In alle gevallen dienen de testomstandigheden voor de bepaling geoptimaliseerd te worden (zie punt 26).

WAARNEMINGEN

Klinische waarnemingen

28. Iedere muis wordt ten minste één keer per dag zorgvuldig geobserveerd op klinische verschijnselen van lokale irritatie op de plaats van aanbrengen of systemische toxiciteit. Alle waarnemingen worden systematisch geregistreerd en van elke muis wordt een apart overzicht bijgehouden. Waarnemingsschema's dienen criteria te omvatten om muizen die tekenen vertonen van systemische toxiciteit, overmatige lokale huidirritatie of huidcorrosie onmiddellijk aan te wijzen voor euthanasie (31).

Lichaamsgewicht

29. Zoals in punt 25 is vermeld, wordt aan het begin van de test en wanneer de dieren volgens schema op humane wijze worden gedood, van elk dier het lichaamsgewicht bepaald.

BEREKENING VAN RESULTATEN

30. De resultaten voor iedere behandelingsgroep worden uitgedrukt als de stimuleringsindex (SI). De SI wordt berekend door de gemiddelde BrdU merkingsindex/muis van elke groep behandeld met teststof en van de PC-groep, te delen door de gemiddelde BrdU merkingsindex/muis voor de oplosmiddel/medium-controlegroep. De gemiddelde SI voor de VC's is dan één.

De BrdU-merkingsindex wordt omschreven als:

$$\text{BrdU-merkingsindex} = (\text{ABS}_{\text{em}} - \text{ABS}_{\text{blanco}_{\text{em}}}) - (\text{ABS}_{\text{ref}} - \text{ABS}_{\text{blanco}_{\text{ref}}})$$

Waarbij: em = emissiegolflengte; en ref = referentiegolflengte.

31. Binnen het beslissingsproces wordt een resultaat als positief beschouwd, indien $SI \geq 1,6$ (10). De sterkte van het verband tussen de dosis en de respons, de statistische significantie en de consistentie van de respons op het medium en de PC kunnen echter ook gebruikt worden om te bepalen of een grensgeval (i.e. SI-waarde tussen 1,6 en 1,9) positief verklaard wordt (3) (6) (32).

32. Voor een net positieve respons met een SI tussen 1,6 en 1,9 kan het nuttig zijn om naast de SI-waarden ook aanvullende informatie zoals het verband tussen de dosis en de respons, bewijs voor systemische toxiciteit of overmatige irritatie, en waar nodig, statistische significantie in aanmerking te nemen om die resultaten als positief aan te merken (10). Er moet ook gekeken worden naar verschillende eigenschappen van de teststof, bijvoorbeeld of deze qua structuur verwant is met bekende huidsensibilisatoren, of de stof overmatige huidirritatie veroorzaakt bij de muis en wat de aard van het waargenomen verband tussen de dosis en de respons is. Deze en andere overwegingen worden elders gedetailleerd besproken (4).

33. Door gegevens te verzamelen op het niveau van de individuele muis, kan een statistische analyse worden uitgevoerd voor het bestaan van een dosis/responsverhouding binnen de gegevens en de mate waarin deze verhouding voorkomt. Elke statistische beoordeling kan een beoordeling van het verband tussen de dosis en de respons behelzen, alsmede gecorrigeerde vergelijkingen tussen testgroepen (*zoals* vergelijkingen tussen een groep die de dosis paarsgewijs toegediend kreeg en een oplossingsmiddel/medium-controlegroep). Statistische analyses kunnen *bijvoorbeeld* een lineaire regressie of een William's test omvatten om de dosis-reactietendensen te beoordelen, en een Dunnett's test om paarsgewijze vergelijkingen te maken. Bij het kiezen van een geschikte statistische analysemethode moet de onderzoeker zich bewust blijven van mogelijke variantie-heterogeniteit en andere soortgelijke problemen, die een gegevenstransformatie of een niet-parametrische statistische analyse noodzakelijk kunnen maken. In ieder geval kan het nodig zijn dat de onderzoeker SI-berekeningen en statistische analyses uitvoert met en zonder bepaalde gegevenspunten (soms „uitbijters” genoemd).

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

34. Gegevens dienen samengevat te worden in de vorm van een tabel waarin de individuele BrdU-merkingsindexwaarden voor de dieren, de gemiddelde BrdU-merkingsindex/dier voor de groep, het bijbehorende residu (bv. SD, SEM) en de gemiddelde SI voor elke doseringsgroep wordt weergegeven en vergeleken wordt met de parallelle oplossingsmiddel/medium-controlegroep.

Testverslag

35. In het testverslag wordt de volgende informatie opgenomen:

Test- en controlestoffen:

- identificatiegegevens (bv. CAS-nummer en EG-nummer, indien beschikbaar; bron; zuiverheid; bekende onzuiverheden; partijnummer);
- de fysische aard en de fysisch-chemische eigenschappen (bv. de vluchtigheid, de stabiliteit en de oplosbaarheid);
- bij een mengsel de samenstelling met voor elk bestanddeel het procentuele gehalte;

Oplosmiddel/medium:

- identificatiegegevens (zuiverheid; concentratie, indien van toepassing; gebruikt volume);
- motivering van de keuze van het medium;

Proefdieren:

- bron van CBA-muizen;
- microbiologische status van de dieren, indien bekend;
- aantal en leeftijd van de dieren;
- de herkomst van de dieren, de huisvesting, de voeding enz.;

Testomstandigheden:

- de bron, het partijnummer en de gegevens van de producent over de kwaliteitsgarantie/kwaliteitscontrole (gevoeligheid van antilichamen en specifieke aard en beperkingen van de opsporing) voor de ELISA-kit;
- gedetailleerde gegevens over de formulering en het aanbrengen van de teststof;
- motivering voor dosiskeuze (met inbegrip van resultaten van voorafgaande screeningtest, indien uitgevoerd);
- gebruikte concentraties van medium en teststof en totale hoeveelheid teststof die is aangebracht;
- gedetailleerde gegevens over de kwaliteit van het voer en het water (waaronder de aard en de herkomst van het voer en de herkomst van het water);
- gedetailleerde gegevens met betrekking tot het behandelings- en bemonsteringsschema;
- methoden voor de meting van de toxiciteit;

- criteria om te bepalen of het resultaat positief of negatief is;
- gedetailleerde gegevens met betrekking tot protocolafwijkingen en een uitleg van hoe de afwijking van invloed is op de opzet en resultaten van het onderzoek;

Betrouwbaarheidscontrole:

- overzicht van de resultaten van de meest recente betrouwbaarheidscontrole met informatie over de teststof, de concentratie en het gebruikte medium;
- tegelijkertijd en/of in het verleden bepaalde positieve en tegelijkertijd bepaalde negatieve (oplosmiddel/medium) controlegegevens voor het testlaboratorium;
- indien geen gelijktijdige PC is uitgevoerd, de datum en het laboratoriumverslag voor de meest recente periodieke PC en een verslag met de historische PC-gegevens voor het laboratorium waarin de beslissing om geen gelijktijdige PC uit te voeren, wordt gemotiveerd;

Resultaten:

- het gewicht van elke muis aan het begin van de test en wanneer ze volgens schema wordt gedood; alsmede het gemiddelde bijbehorende residu (bv. SD, SEM) voor elke behandelingsgroep;
- voor elk dier het tijdstip waarop de eventuele toxiciteitsverschijnselen zich voordoen, met inbegrip van huidirritatie op de toedieningsplaats, en het verloop daarvan;
- een tabel met de BrdU-merkingsindices voor elke muis en de SI-waarden voor elke doseringsgroep;
- gemiddelde bijbehorende residu (bv. SD, SEM) voor BrdU-merkingsindex/muis voor elke behandelingsgroep en de resultaten van de uitbijteranalyse voor elke behandelingsgroep;
- berekende SI en een geschikte meting van de variabiliteit die rekening houdt met de spreiding over de dieren in zowel de teststof- als de controlegroepen;
- het verband tussen dosis en respons;
- statistische analyses, indien van toepassing;

Bespreking van de resultaten:

- Een korte bespreking van de resultaten, de dosis/respons-analyse en de statistische analyses, indien van toepassing, met een conclusie ten aanzien van de vraag of de teststof als huidsensibilisator moet worden beschouwd.

LITERATUUR

- (1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999-1002.
- (3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985-997.
- (4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327-33.
- (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. Available at: [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. Available at: [<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. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPrept2009.pdf]
- (12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.*, 25, 129-134.
- (13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<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. Available at: [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. Available at: [<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. Available at: [<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. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].
- (31) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Available at: [<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. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Nauwkeurigheid: de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de testmethode en erkende referentiewaarden. Het is een maat voor de prestaties van de testmethode en één aspect van relevantie. Deze term en de term „concordantie”, waaronder het percentage correcte uitkomsten van een testmethode wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt (33).

Ijkstof: een sensibiliserende of niet-sensibiliserende stof die gebruikt wordt als norm voor vergelijking met een teststof. Een ijkstof dient de volgende eigenschappen te hebben: i) consistente en betrouwbare bron(nen); ii) in structureel en functioneel opzicht soortgelijk aan de geteste klasse stoffen; iii) bekende fysisch-chemische eigenschappen; iv) ondersteunende gegevens met betrekking tot bekende effecten; en v) bekende potentie binnen het bereik van de gewenste respons.

Valsnegatief: een teststof die door een testmethode ten onrechte als negatief of niet-actief wordt geïdentificeerd, terwijl de stof feitelijk positief of actief is (33).

Valspositief: een teststof die ten onrechte als positief of actief wordt geïdentificeerd, terwijl de stof in feite negatief of niet-actief is (33).

Gevaar: het risico van een nadelig effect op de gezondheid of het milieu. Het nadelige effect doet zich alleen voor indien er voldoende blootstelling is.

Interlaboratoriumreproduceerbaarheid: een maatstaf voor de mate waarin verschillende gekwalificeerde laboratoria die gebruikmaken van hetzelfde protocol en die dezelfde teststoffen testen, in kwalitatief en kwantitatief opzicht vergelijkbare resultaten kunnen produceren. De interlaboratoriumreproduceerbaarheid wordt bepaald tijdens de prevaliderings- en valideringsprocessen en geeft aan in hoeverre een test met succes tussen laboratoria kan worden overgedragen; dit wordt ook wel reproduceerbaarheid tussen laboratoria genoemd (33).

Intralaboratoriumreproduceerbaarheid: een bepaling van de mate waarin gekwalificeerde mensen binnen hetzelfde laboratorium met succes resultaten kunnen repliceren met gebruikmaking van een specifiek protocol op verschillende tijdstippen. Dit wordt ook reproduceerbaarheid binnen laboratoria genoemd (33).

Uitbijter: een uitbijter is een waarneming die duidelijk afwijkt van andere waarden binnen een willekeurige steekproef uit een populatie.

Kwaliteitsborging: een beheerproces waarbij de naleving van de testnormen, eisen en boekhoudingsprocedures voor laboratoria alsmede de nauwkeurigheid van de gegevensoverdracht worden beoordeeld door personen die onafhankelijk zijn van degenen die de tests uitvoeren.

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een testmethode, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden toegepast. De betrouwbaarheid wordt beoordeeld door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid (33).

Huidsensibilisatie: een immunologisch proces dat ontstaat wanneer een vatbare persoon of proefdier plaatselijk wordt blootgesteld aan een inducerend chemisch allergeen, dat een immunologische huidreactie veroorzaakt die kan leiden tot de ontwikkeling van contactsensibilisatie.

Stimuleringsindex (SI): een waarde die wordt berekend om het huidsensibilisatiepotentieel van een teststof te beoordelen en die gelijk is aan de verhouding van de proliferatie bij behandelde groepen ten opzichte van de proliferatie bij de gelijktijdig met medium behandelde controlegroep.

Teststof: iedere stof of ieder mengsel die/dat met deze TM wordt getest."
