KUNSILL TAL-UNJONI EWROPEA	**Brussell, 20 ta' Jannar 2012 (23.01) (OR. en)**
	5596/12 ADD 1
	COMPET 31 ENV 35 CHIMIE 3 MI 37 ENT 15

NOTA TA' TRASMISSJONI

minn:	Kummissjoni Ewropea
data meta waslet:	19 ta' Jannar 2012
lil:	Segretarjat Ġenerali tal-Kunsill
Suġġett:	Anness għar-Regolament tal-Kummissjoni (UE) Nru .../... li jemenda, bil-għan li jadattah għall-progress tekniku, ir-Regolament (KE) Nru 440/2008 li jistabbilixxi metodi ta' ttestjar skont ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill dwar ir-reġistrazzjoni, il-valutazzjoni, l-awtorizzazzjoni u r-restrizzjoni ta' sustanzi kimiċi (REACH)

Id-delegazzjonijiet għandhom isibu mehmuż dokument tal-Kummissjoni D018298/01 Anness.

Mehmuż: D018298/01 Anness

D018298/01

ANNESS

L-Anness għar-Regolament (KE) Nru 440/2008 huwa emendat kif ġej:

1. Il-Kapitolu B.42 għandu jiġi sostitwit b'li ġej:

"B.42 Sensitizzazzjoni tal-Ġilda: Analiżi tan-Nodula tal-Limfa Lokali

INTRODUZZJONI

1. Il-Linji gwida tal-OECD għall-Ittestjar tas-Sustanzi Kimiċi u l-Metodi ta' Ttestjar tal-UE bbażati fuqhom jiġu analizzati minn żmien għal żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku, ħtiġijiet regolatorji li jinbidlu, u kunsiderazzjonijiet dwar il-benessri tal-annimali. Il-Metodu ta' Ttestjar oriġinali (TM) għad-determinazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda fil-ġurdien, l-Analiżi tan-Nodula tal-Limfa Lokali (LLNA; Linja Gwida ta' Ttestjar 429 tal-OECD; il-Kapitolu B.42 ta' dan l-Anness) ġie adottat qabel (1) Id-dettalji tal-validazzjoni tal-LLNA u analiżi tax-xogħol assoċjat ġew ippubblikati (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). L-LLNA aġġornata hija bbażata fuq l-evalwazzjoni tal-esperjenza u tad-dejta xjentifika (12). Dan huwa t-tieni TM imfassal għall-valutazzjoni tal-potenzjal tas-sustanzi kimiċi li jikkawżaw sensitizzazzjoni tal-ġilda (sustanzi u taħlitiet) fl-annimali. It-TM l-ieħor (jiġifieri l-Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar; il-Kapitolu B.6 ta' dan l-Anness) juża testijiet fuq il-fniek tal-Indi, b'mod partikolari t-test ta' massimizzazzjoni fuq il-fenek tal-Indi u t-test Buehler (13). L-LLNA tipprovdi vantaġġi fuq il-B.6 u fuq il-Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar (13) fir-rigward tal-benessri tal-annimali. Dan it-TM aġġornat tal-LLNA jinkludi sett ta' Standards ta' Prestazzjoni (PS) (Appendiċi 1) li jistgħu jintużaw fl-evalwazzjoni tal-istatus ta' validazzjoni ta' metodi ġodda u/jew mibdula ta' ttestjar li huma mekkanikament u funzjonalment simili għal-LLNA, f'konformità mal-prinċipji tad-Dokument ta' Gwida Nru 34 tal-OECD (14).

2. L-LLNA tistudja l-fażi ta' induzzjoni ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda u tipprovdi dejta kwantitattiva adattata għall-valutazzjoni tad-doża u r-reazzjoni. Għandu jiġi nnotat li s-sensitizzaturi ħfief/moderati li huma rrakkomandati bħala sustanzi kimiċi ta' kontroll pożittiv adattati (PC) għall-metodi ta' ttestjar fuq il-fniek tal-Indi (jiġifieri B. 6; Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar) (13) huma adattati wkoll għall-użu mal-LLNA (6) (8) (15). L-approċċ ta' LLNA mnaqqsa (rLLNA), li tista' tuża sa 40 % inqas annimali huwa deskritt ukoll bħala għażla f'dan it-TM (16) (17) (18). L-rLLNA tista' tintuża meta jkun hemm ħtieġa regolatorja li tiġi kkonfermata previżjoni negattiva tal-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda, sakemm ikun hemm konformità mal-ispeċifikazzjonijiet l-oħrajn kollha ta' protokoll tal-LLNA, kif deskritt f'dan it-TM. Il-previżjoni ta' eżitu negattiv għandha ssir fuq il-bażi tal-informazzjoni kollha disponibbli kif deskritt fil-paragrafu 4. Qabel ma jiġi applikat l-approċċ rLLNA, għandhom jiġu pprovduti ġustifikazzjonijiet ċari u loġika xjentifika għall-użu tiegħu. Jekk, kontra dak mistenni, jinkiseb riżultat pożittiv jew ekwivoku fl-rLLNA, jista' jkun meħtieġ aktar ittestjar sabiex tiġi interpretata jew iċċarata s-sejba. L-rLLNA ma għandhiex tintuża għall-identifikazzjoni tal-periklu ta' sustanzi ta' testijiet li jikkawżaw sensitizzazzjoni tal-ġilda meta tkun meħtieġa informazzjoni dwar ir-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni bħas-subkategorizzazzjoni għar-Regolament (KE) Nru 1272/2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet u s-Sistema Globalment Armonizzata tan-NU tal-Klassifikazzjoni u t-Tikkettar tas-Sustanżi Kimiċi.

DEFINIZZJONIJIET

3. Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi 2.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

4. L-LLNA tipprovdi metodu alternattiv għall-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi li jistgħu jikkawżaw sensitizzazzjoni tal-ġilda. Dan mhux neċessarjament jimplika li l-LLNA għandha tintuża minflok it-testijiet fuq il-fniek tal-Indi fil-każijiet kollha (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar) (14), iżda pjuttost li l-analiżi għandha l-istess mertu u tista' tintuża bħala alternattiva li fiha r-riżultati pożittivi u negattivi ġeneralment ma jkunux jeħtieġu aktar konferma. Il-laboratorju tal-ittestjar għandu jikkunsidra l-informazzjoni disponibbli kollha fuq is-sustanza tat-test qabel iwettaq l-istudju. Din l-informazzjoni għandha tinkludi l-identità u l-istruttura kimika tas-sustanza tat-test; il-karatteristiċi fiżikokimiċi tagħha; ir-riżultati ta' kwalunkwe test ta' tossiċità *in vitro* jew *in vivo* fuq is-sustanza tat-test; u dejta tossikoloġika dwar sustanzi kimiċi strutturalment relatati. Din l-informazzjoni għandha titqies sabiex wieħed jiddetermina jekk l-LLNA hijiex adattata għas-sustanza (minħabba n-nuqqas ta' kompatibbiltà ta' tipi limitati ta' sustanzi kimiċi mal-LLNA- ara l-paragrafu 5) u sabiex tgħin fl-għażla tad-doża.

5. L-LLNA huwa metodu *in vivo* u, b'konsegwenza ta' dan, ma jeliminax l-użu tal-annimali fil-valutazzjoni ta' attività ta' sensitizzazzjoni ta' kuntatt allerġiku. Għandu, madankollu, il-potenzjal li jnaqqas l-għadd ta' annimali meħtieġa għal dan il-għan. Barra minn hekk, l-LLNA toffri rfinar sostanzjali (inqas uġigħ u tbatija) fil-mod kif jintużaw l-annimali għall-ittestjar tas-sensitizzazzjoni ta' kuntatt allerġiku. L-LLNA hija bbażata fuq il-kunsiderazzjoni ta' avvenimenti immunoloġiċi stimulati b'sustanzi kimiċi matul il-fażi induttiva tas-sensitizzazzjoni. Għall-kuntrarju tat-testijiet fuq il-fenek tal-Indi (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar) (13) l-LLNA ma teħtieġx li r-reazzjonijiet tal-ipersensittività tal-ġilda indotti bi sfida jkunu eluċidati. Barra minn hekk, l-LLNA ma teħtieġx l-użu ta' aġġuvant, bħal fil-każ tat-test tal-massimizzazzjoni fuq il-fenek tal-Indi (13). Għalhekk, l-LLNA tnaqqas l-uġigħ u t-tbatija tal-annimali. Minkejja l-vantaġġi tal-LLNA fuq B.6 u l-Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar, għandu jkun rikonoxxut li hemm ċerti limitazzjonijiet li jistgħu jkunu jeħtieġu l-użu ta' B.6 jew tal-Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar (13) (eż. sejbiet negattivi foloz fl-LLNA b'ċerti metalli, sejbiet pożittivi foloz b'ċerti irritanti tal-ġilda [bħal ċerti sustanzi kimiċi tat-tip tensjoattivi] (19) (20), jew solubbiltà tas-sustanza tat-test). Barra minn hekk, il-klassijiet ta' sustanzi kimiċi jew sustanzi li fihom gruppi funzjonali li ntwerew li jaġixxu bħala konfondituri potenzjali (21) jistgħu jeħtieġu l-użu ta' testijiet fuq il-fniek tal-Indi (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar (13). Barra minn hekk, skont il-bażi tad-dejta ta' validazzjoni limitata, li kienet tikkonsisti prinċipalment minn formulazzjonijiet ta' pestiċidi, l-LLNA aktarx li tagħti aktar riżultat pożittiv mit-test fuq il-fniek tal-Indi għal dawn it-tipi ta' sustanzi tat-test (22). Madankollu, meta wieħed jeżamina l-formulazzjonijiet, jista' jikkunsidra li jinkludi sustanzi simili b'riżultati magħrufa bħala sustanzi ta' referenza sabiex juri li l-LLNA qiegħda taħdem kif suppost (ara l-paragrafu 16). Minbarra dawn il-limitazzjonijiet identifikati, l-LLNA għandha tkun applikabbli għall-ittestjar ta' kwalunkwe sustanza diment li ma jkunx hemm karatteristiċi assoċjati ma' dawn is-sustanzi li jistgħu jinterferixxu mal-eżattezza tal-LLNA.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

6. Il-prinċipju bażiku wara l-LLNA huwa li s-sensitizzaturi jikkawżaw il-proliferazzjoni ta' limfoċiti fin-noduli tal-limfa li jsaffu s-sit tal-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Din il-proliferazzjoni hija proporzjonata mad-doża u mal-qawwa tal-allerġen applikat u tipprovdi mezz sempliċi ta' kif wieħed jikseb kejl kwantitattiv ta' sensitizzazzjoni. Il-proliferazzjoni titkejjel billi wieħed iqabbel il-proliferazzjoni medja f'kull grupp tat-test mal-proliferazzjoni medja fil-grupp ta' kontroll ittrattati bil-mezzi (vehicle treated control, VC). Il-proporzjon tal-proliferazzjoni medja f'kull grupp ittrattat ma' dak fil-grupp VC simultanju, imsejjaħ l-Indiċi ta' Stimulazzjoni (SI), jiġi stabbilit, u għandu jkun ≥3 qabel ma tkun meħtieġa l-klassifikazzjoni tas-sustanza tat-test bħala sensitizzatur potenzjali tal-ġilda. Il-proċeduri deskritti hawnhekk huma bbażati fuq l-użu ta' tikkettar radjoattiv *in vivo* għall-kejl ta' żieda fl-għadd ta' ċelloli proliferanti fin-noduli tal-limfa awrikolari li jsaffu. Madankollu, jistgħu jintużaw għanijiet finali oħrajn għall-valutazzjoni tal-għadd ta' ċelloli proliferanti sakemm ir-rekwiżiti tal-PS ikunu għalkollox issodisfati (Appendiċi 1).

DESKRIZZJONI TAL-ANALIŻI

L-għażla tal-ispeċijiet tal-annimali

7. Il-ġurdien huwa l-ispeċi magħżula għal dan it-test. Jintużaw ġrieden nisa adulti żgħażagħ tar-razza CBA/Ca jew CBA/J, li jkunu għadhom mhux mgħammra u mhux tqal. Fil-bidu tal-istudju, l-annimali għandu jkollhom bejn 8 u 12-il ġimgħa, u l-varjazzjoni fil-piż tal-annimali għandha tkun minima u ma taqbiżx l-20 % tal-piż medju. Inkella, jistgħu jintużaw razez oħrajn u ġrieden irġiel meta tkun iġġenerata biżżejjed dejta li turi li ma jeżistux differenzi sinifikanti speċifiċi għar-razez u/jew għas-sess fir-reazzjoni għal-LLNA.

Il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ u l-għalf

8. Il-ġrieden għandhom jinżammu fi gruppi (23), sakemm ma tingħatax loġika xjentifika adegwata għat-tqegħid tal-ġrieden f'gaġeġ individwali. It-temperatura tal-kamra tal-annimali sperimentali għandha tkun ta' 22 ± 3ºC. Għalkemm l-umdità relattiva għandha tkun mill-inqas 30 % u preferibbilment ma taqbiżx is-70 % ħlief waqt it-tindif tal-kamra, l-għan għandu jkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, b'sekwenza ta' 12-il siegħa dawl, u 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, jistgħu jintużaw id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb.

It-tħejjija tal-annimali

9. L-annimali għandhom jintgħażlu b'mod aleatorju, immarkati sabiex ikunu jistgħu jiġu identifikati individwalment (iżda mingħajr l-ebda forma ta' mmarkar fil-widnejn), u miżmuma fil-gaġeġ tagħhom għal mill-inqas ħamest ijiem qabel ma jibda d-dożar sabiex ikunu jistgħu jidraw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju. Qabel ma jibda t-trattament, l-annimali kollha għandhom jiġu eżaminati sabiex jiġi żgurat li ma jkollhom l-ebda ferita osservabbli fuq il-ġilda.

It-tħejjija tas-soluzzjonijiet għad-dożar

10. Is-sustanzi kimiċi solidi għandhom jinħallu jew jiġu sospiżi f'solventi/mezzi u dilwiti, jekk ikun xieraq, qabel l-applikazzjoni fuq il-widna tal-ġrieden. Is-sustanzi kimiċi likwidi jistgħu jiġu applikati waħedhom jew dilwiti qabel id-dożar. Is-sustanzi kimiċi li ma jinħallux, bħal dawk li naraw ġeneralment fl-apparat mediku, għandhom ikunu soġġetti għal estrazzjoni eżaġerata f'solvent adattat sabiex jiżvelaw il-kostitwenti kollha li jistgħu jiġu

estratti għall-ittestjar qabel jiġu applikati fuq il-widna tal-ġrieden. Is-sustanzi tat-test għandhom jitħejjew kuljum sakemm id-dejta dwar l-istabilità ma turix li jistgħu jinħażnu.

Il-verifika tal-affidabbiltà

11. Is-sustanzi kimiċi ta' kontroll pożittiv (PC) jintużaw sabiex tintwera prestazzjoni xierqa tal-analiżi billi jirreaġixxu b'sensittività adegwata u riproduċibbli bħala sustanza tat-test sensitizzanti li għaliha l-kobor tar-reazzjoni huwa kkaratterizzat sew. L-inklużjoni ta' PC simultanju hija rrakkomandata għaliex din turi l-kompetenza tal-laboratorju li jwettaq b'suċċess kull analiżi u tippermetti l-valutazzjoni u t-tqabbil tar-riproduċibbiltà fil-laboratorju u bejn il-laboratorji. Huwa meħtieġ ukoll PC għal kull studju wkoll minn ċerti awtoritajiet regolatorji u għaldaqstant l-utenti huma mħeġġa sabiex jikkonsultaw lill-awtoritajiet rilevanti qabel ma jwettqu l-LLNA. Għalhekk, l-użu ta' rutina ta' PC simultanju huwa rrakkomandat sabiex tiġi evitata l-ħtieġa ta' aktar ittestjar fuq l-annimali sabiex jintlaħqu r-rekwiżiti li jistgħu jinħolqu mill-użu ta' PC perjodiku (ara l-paragrafu 12). Il-PC għandu jipproduċi reazzjoni tal-LLNA pożittiva f'livell ta' esponiment li mistenni jagħti żieda fl-SI > 3 fuq il-grupp ta' kontroll negattiv (NC). Id-doża tal-PC għandha tintgħażel b'mod li ma tikkawżax irritazzjoni eċċessiva fil-ġilda jew tossiċità sistemika u l-induzzjoni tkun riproduċibbli iżda mhux eċċessiva (jiġifieri SI > 20 ikun eċċessiv). Il-PC preferuti huma 25 % eżil ċinnamaldeid (Chemical Abstracts Service - [CAS] Nru tal-CAS 101-86-0) fl-aċetun: żejt taż-żebbuġa (4:1, v/v) u 5% merkaptobenżotijażol (Nru tal-CAS 149-30-4) f'*N,N*-dimetilformammid (ara l-Appendiċi 1, it-Tabella 1). Jista' jkun hemm ċirkostanzi fejn, minħabba ġustifikazzjoni adegwata, jistgħu jintużaw PCs oħrajn, li jissodisfaw il-kriterji ta' hawn fuq.

12. Għalkemm l-inklużjoni ta' grupp ta' PC simultanju hija rrakkomandata, jista' jkun hemm sitwazzjonijiet fejn l-ittestjar perjodiku (jiġifieri f'intervalli ≤ 6 xhur) tal-PC jista' jkun adegwat għal-laboratorji li jagħmlu l-LLNA b'mod regolari (jiġifieri jagħmlu l-LLNA fi frekwenza ta' mhux inqas minn darba fix-xahar) u għandhom bażi tad-dejta ta' PC storiku stabbilita li turi l-kapaċità tal-laboratorju biex jikseb riżultati riproduċibbli u eżatti b'PCs. Profiċjenza adegwata bl-LLNA tista' tintwera b'suċċess billi jiġu ġġenerati riżultati pożittivi konsistenti bil-PC f'mill-inqas 10 testijiet indipendenti li jsiru f'perjodu ta' żmien raġonevoli (jiġifieri inqas minn sena).

13. Grupp ta' PC simultanju għandu dejjem ikun inkluż meta jkun hemm bidla fil-proċedura tal-LLNA (eż. bidla fil-persunal imħarreġ, bidla fil-materjali tal-metodu tat-test u/jew fir-reaġenti, bidla fit-tagħmir tal-metodu tat-test, bidla fis-sors tal-annimali tat-test), u dawn il-bidliet għandhom ikunu ddokumentati fir-rapporti tal-laboratorju. Għandu jiġi kkunsidrat l-impatt ta' dawn il-bidliet fuq l-adegwatezza tal-bażi tad-dejta storika stabbilita qabel ma tiġi deċiża l-ħtieġa li tkun stabbilita bażi tad-dejta storika ġdida sabiex tiddokumenta l-konsistenza fir-riżultati tal-PC.

14. Ir-riċerkaturi għandhom ikunu konxji li d-deċiżjoni li jsir studju tal-PC fuq bażi perjodika minflok fl-istess ħin għandha konsegwenzi fuq l-adegwatezza u l-aċċettabbiltà tar-riżultati ta' studju negattivi ġġenerati mingħajr PC simultanju waqt l-intervall bejn kull studju tal-PC perjodiku. Pereżempju, jekk jinkiseb riżultat negattiv falz fl-istudju tal-PC perjodiku, ir-riżultati negattivi tas-sustanza tat-test miksuba fl-intervall bejn l-aħħar studju tal-PC perjodiku aċċettabbli u l-istudju tal-PC perjodiku mhux aċċettabbli jistgħu jkunu dubjużi. L-implikazzjonijiet ta' dawn l-eżiti għandhom jiġu kkunsidrati b'attenzjoni meta jiġi deċiż jekk għandhomx ikunu inklużi PCs simultanji jew li jsiru biss PCs perjodiċi. Għandu jiġi kkunsidrat ukoll l-użu ta' inqas annimali fil-grupp ta' PC simultanju meta dan ikun

iġġustifikat xjentifikament u jekk il-laboratorju juri, fuq dejta storika speċifika għal-laboratorju, li jistgħu jintużaw inqas ġrieden (12).

15. Għalkemm il-PC għandu jiġi ttestjat fil-mezz li huwa magħruf li jqanqal reazzjoni konsistenti (eż. aċetun: żejt taż-żebbuġa; 4:1, v/v), jista' jkun hemm ċerti sitwazzjonijiet regolatorji li fihom l-ittestjar f'mezz mhux standard (formulazzjoni rilevanti klinikament/kimikament) ikun meħtieġ ukoll (24). Jekk il-PC simultanju jiġi ttestjat f'mezz differenti mis-sustanza tat-test, allura għandu jiġi inkluż VC separat għall-PC simultanju.

16. F'każijiet fejn ikunu qegħdin jiġu vvalutati sustanzi tat-test ta' klassi speċifika ta' sustanzi kimiċi jew firxa ta' reazzjonijiet, is-sustanzi ta' referenza jistgħu jkunu utli wkoll sabiex juru li l-metodu ta' ttestjar qed jaħdem sew sabiex isib il-potenzjal tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' dawn it-tipi ta' sustanzi tat-test. Is-sustanzi ta' referenza adattati għandu jkollhom il-karatteristiċi li ġejjin:

- xebh strutturali u funzjonali mal-klassi ta' sustanzi tat-test li qegħdin jiġu ttestjati;
- karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufa;
- dejta ta' appoġġ mil-LLNA;
- dejta ta' appoġġ minn mudelli oħrajn ta' annimali u/jew mill-bnedmin.

IL-PROĊEDURA TAT-TEST

Għadd ta' annimali u livelli ta' doża

17. Minimu ta' erba' annimali għandhom jintużaw għal kull grupp ta' doża, b'minimu ta' tliet konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test, flimkien ma' grupp ta' NC simultanju ttrattat biss bil-mezz għas-sustanza tat-test, u PC (simultanju jew reċenti, ibbażat fuq il-politika tal-laboratorju fl-ikkunsidrar tal-paragrafi 11-15). Għandu jiġi kkunsidrat l-ittestjar ta' dożi multipli tal-PC, b'mod speċjali meta wieħed jittestja l-PC fuq bażi intermittenti. Ħlief għan-nuqqas ta' trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-gruppi ta' kontroll għandhom ikunu mmaniġġjati u ttrattati bl-istess mod bħall-annimali fil-gruppi tat-trattament.

18. L-għażla tad-doża u tal-mezz għandha tkun ibbażata fuq ir-rakkomandazzjonijiet mogħtija fir-referenzi (3) u (5). Dożi konsekuttivi normalment jintgħażlu minn sensiela xierqa ta' konċentrazzjonijiet bħal 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2.5 %, 1 %, 0.5 %, eċċ. Loġika xjentifika adegwata għandha takkumpanja l-għażla tas-sensiela ta' konċentrazzjonijiet użati. L-informazzjoni tossikoloġika kollha eżistenti (eż. tossiċità akuta u irritazzjoni fil-ġilda) u l-informazzjoni strutturali u fiżikokimika dwar is-sustanza tat-test ta' interess (u/jew sustanzi relatati strutturalment) għandhom jiġu kkunsidrati meta jkunu disponibbli, fl-għażla tat-tliet konċentrazzjonijiet konsekuttivi biex b'hekk l-ogħla konċentrazzjoni timmassimizza l-esponiment filwaqt li tevita t-tossiċità sistemika u/jew l-irritazzjoni lokali eċċessiva fil-ġilda (3) (25). Fin-nuqqas ta' informazzjoni bħal din, jista' jkun meħtieġ test inizjali qabel l-iskrinjar (ara l-paragrafi 21-24).

19. Il-mezz ma għandux jinterferixxi ma' jew jinfluwenza r-riżultat tat-test u għandu jintgħażel fuq il-bażi tal-massimizzazzjoni tas-solubbiltà sabiex tinkiseb l-ogħla konċentrazzjoni li tista' tinkiseb filwaqt li tiġi prodotta soluzzjoni/sospensjoni adattata għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Il-mezzi rakkomandati huma aċetun: żejt taż-żebbuġa (4:1, v/v), *N,N*-dimetilformammid, metiletilketon, propilen glikol, u dimetilsulfossidu (19) iżda

jistgħu jintużaw oħrajn jekk tingħata loġika xjentifika suffiċjenti. F'ċerti sitwazzjonijiet jista' jkun meħtieġ li jintuża solvent klinikament rilevanti jew il-formulazzjoni kummerċjali li fiha s-sustanza tat-test tkun ikkummerċjalizzata bħala kontroll addizzjonali. Għandha tingħata attenzjoni partikolari sabiex ikun żgurat li s-sustanzi tat-test idrofiliċi jkunu inkorporati f'sistema ta' mezzi, li xxarrab il-ġilda u ma ċċarċarx mal-ewwel, permezz tal-inkorporazzjoni ta' sustanzi li jħollu xierqa (eż. 1 % Pluronic® L92). Għalhekk, mezzi għalkollox likwidi għandhom jiġu evitati.

20. L-ipproċessar ta' noduli tal-limfa minn ġrieden individwali jippermetti l-valutazzjoni tal-varjabbiltà bejn l-annimali u tqabbil statistiku tad-differenza bejn is-sustanza tat-test u l-kejl tal-grupp VC (ara l-paragrafu 35). Barra minn hekk, il-valutazzjoni tal-possibbiltà li jitnaqqas l-għadd ta' ġrieden fil-grupp PC hija fattibbli meta tinġabar dejta dwar annimali individwali (12). Barra minn hekk, ċerti awtoritajiet regolatorji jitolbu l-ġbir ta' dejta dwar annimali individwali. Madankollu, id-dejta dwar gruppi ta' annimali tista' titqies aċċettabbli minn ċerti awtoritajiet regolatorji u f'dawn is-sitwazzjonijiet, l-utenti jista' jkollhom l-għażla li jiġbru kemm dejta dwar annimali individwali kif ukoll dejta dwar gruppi ta' annimali.

Test ta' qabel l-iskrinjar

21. Fin-nuqqas ta' informazzjoni sabiex tkun iddeterminata l-ogħla doża li għandha tiġi ttestjata (ara l-paragrafu (18), għandu jsir test ta' qabel l-iskrinjar sabiex jiġi ddefinit il-livell ta' doża xierqa li għandha tkun ittestjata fl-LLNA. L-iskop tat-test ta' qabel l-iskrinjar huwa li jipprovdi gwida għall-għażla tal-livell massimu ta' doża li għandu jintuża fl-istudju ewlieni tal-LLNA, meta l-informazzjoni dwar il-konċentrazzjoni li tikkawża tossiċità sistemika (ara l-paragrafu 24) u/jew irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda (ara l-paragrafu 23) ma tkunx disponibbli. Il-livell massimu tad-doża ttestjata għandu jkun 100 % tas-sustanza tat-test għal-likwidi jew il-konċentrazzjoni massima possibbli għas-solidi jew għas-sospensjonijiet.

22. It-test ta' qabel l-iskrinjar isir skont l-istess kundizzjonijiet tal-istudju ewlieni tal-LLNA, ħlief għall-fatt li ma jkunx hemm valutazzjoni tal-proliferazzjoni tan-noduli tal-limfa u li jistgħu jintużaw inqas annimali għal kull grupp ta' doża. Huwa ssuġġerit li jintuża annimal wieħed jew tnejn għal kull grupp ta' doża. Il-ġrieden kollha jiġu osservati kuljum għal kwalunkwe sinjal kliniku ta' tossiċità sistemika jew irritazzjoni lokali fis-sit tal-applikazzjoni. Il-piżijiet tal-ġisem jiġu ddokumentati qabel it-test u wara li jintemm (Jum 6). Il-widnejn ta' kull ġurdien jiġu osservati għall-eritema (ħmura) u jingħataw punteġġ skont it-Tabella 1 (25). Jittieħed il-kejl tal-ħxuna tal-widna permezz ta' gejġ ta' ħxuna (*eż.* mikrometru diġitali jew gejġ tal-ħxuna Peacock Dial) f'Jum 1 (qabel id-doża), f'Jum 3 (madwar 48 siegħa wara l-ewwel doża), u f'Jum 6. Barra minn hekk, fis-sitt Jum, il-ħxuna tal-widna tista' tiġi stabbilita permezz ta' determinazzjonijiet tal-piż bl-immarkar tal-widnejn, li għandu jsir wara li l-annimali jinqatlu b'mod uman. L-irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda hija indikata b'punteġġ ta' eritema ≥3 u/jew żieda fil-ħxuna tal-widna ta' ≥25 % fi kwalunkwe jum tal-kejl (26) (27). L-ogħla doża magħżula għall-istudju ewlieni tal-LLNA tkun id-doża l-aktar baxxa li jmiss fis-sensiela ta' konċentrazzjonijiet ta' qabel l-iskrinjar (ara l-paragrafu 18) li ma tikkawżax tossiċità sistemika u/jew irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda.

Tabella 1: Punteġġi għall-eritema

Osservazzjoni	Punteġġ

L-ebda eritema	0
Ftit li xejn eritema (bil-kemm tidher)	1
Eritema definita sew	2
Eritema moderata sa severa	3
Eritema severa (ħmura qawwija) sa formazzjoni ta' tessut oħxon u danneġġat li jipprevjeni l-klassifikazzjoni tal-eritema	4

23. Minbarra żieda ta' 25 % fil-ħxuna tal-widna (26) (27), intużat ukoll żieda statistikament sinifikanti fil-ħxuna tal-widna fil-ġrieden ittrattati meta mqabbla mal-ġrieden tal-kontroll sabiex jiġu identifikati sustanzi irritanti fl-LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Madankollu, għalkemm jistgħu jseħħu żidiet statistikament sinifikanti meta l-ħxuna tal-widna tkun inqas minn 25 % dawn ma ġewx assoċjati b'mod speċifiku ma' irritazzjoni eċċessiva (30) (31) (32) (33) (34).

24. L-osservazzjonijiet kliniċi li ġejjin jistgħu jindikaw tossiċità sistemika (35) (36) meta jintużaw bħala parti minn valutazzjoni integrata u għalhekk jistgħu jindikaw il-livell massimu tad-doża li għandha tintuża fl-LLNA ewlenija: bidliet fil-funzjoni tas-sistema nervuża (*eż.* pil wieqaf, atassja, rogħda, u konvulżjonijiet); bidliet fl-imġiba (eż. aggressività, bidla fl-attività tal-indafa, bidla sinifikanti fil-livell ta' attività); bidliet fit-tendenzi respiratorji (jiġifieri bidliet fil-frekwenza u fl-intensità tan-nifs bħal dispnea, nifs maqtugħ, u ħsejjes fil-pulmun (rales)), u bidliet fil-konsum tal-ikel u tal-ilma. Barra minn hekk, sinjali ta' letarġija u/jew nuqqas ta' reazzjoni u kull sinjal kliniku ieħor ta' aktar minn uġigħ jew tbatija żgħira jew momentanja, jew tnaqqis ta' >5 % fil-piż tal-ġisem mill-ewwel Jum sas-sitt Jum, u l-imwiet għandhom jiġu kkunsidrati fil-valutazzjoni. Annimali li waslu biex imutu jew annimali li jkunu viżibbilment muġugħa jew li juru sinjali ta' tbatija kbira u persistenti għandhom jinqatlu b'mod uman (37).

Skeda ta' sperimentazzjoni tal-istudju ewlieni

25. L-iskeda ta' sperimentazzjoni tal-analiżi hija kif ġej:

- <u>*L-ewwel Jum:*</u>

  Identifika individwalment u ħu nota tal-piż ta' kull annimal u ta' kwalunkwe osservazzjoni klinika. Applika 25 μL tad-dilwizzjoni xierqa tas-sustanza tat-test, il-mezz waħdu, jew il-PC (simultanja jew reċenti, skont il-politika tal-laboratorju fl-ikkunsidrar tal-paragrafi 11-15), fuq il-wara ta' kull widna.

- <u>*It-tieni u t-tielet Jum:*</u>

  Irrepeti l-proċedura ta' applikazzjoni li għamilt fl-ewwel Jum.

- <u>*Ir-raba' u l-ħames Jum:*</u>

  L-ebda trattament.

- *Is-sitt jum:*

  Ħu nota tal-piż ta’ kull annimal. Injetta 250 µL ta’ soluzzjoni ta' ilma bil-melħ ibbaferjata bil-fosfat (phosphate-buffered saline, PBS) sterili li fih 20 µCi (7.4×10^5 Bq) ta’ (^{3}H)-metiltimidin ittritjat fil-ġrieden kollha tat-test u tal-kontroll permezz tal-vina fid-denb. Inkella, injetta 250 µL PBS sterili li fih 2 µCi (7.4×10^4 Bq) ta’ ^{125}I-jododeossiuridin u 10^{-5}M fluworodeossiuridin fil-ġrieden kollha permezz tal-vina fid-denb. Ħames (5) sigħat wara, oqtol l-annimali b’mod uman. Aqta’ n-noduli limfatiċi awrikolari li jnixxu minn kull widna tal-ġrieden u pproċessa flimkien f’PBS għal kull annimal (metodu b’annimali individwali); inkella aqta’ u iġbor in-noduli limfatiċi minn kull widna f’PBS għal kull grupp ta’ trattament (metodu bi gruppi ta’ trattament miġbura). Id-dettalji u d-dijagrammi tal-identifikazzjoni u d-dissezzjoni tan-noduli limfatiċi tinsab fir-referenza (12). Sabiex tkompli tissorvelja r-reazzjoni lokali tal-ġilda fl-istudju ewlieni, jistgħu jiġu inklużi parametri oħrajn bħall-għoti ta’ punti għall-eritema fil-widna jew il-kejl tal-ħxuna tal-widna (miksuba kemm permezz ta’ gejġ tal-ħxuna, kif ukoll permezz tad-determinazzjonijiet tal-piżijiet bl-immarkar tal-widna fl-awtopsja) fil-protokoll tal-istudju.

It-tħejjija tas-sospensjonijiet taċ-ċelloli

26. Sospensjoni ta’ ċellola waħda ta’ ċelloli tan-noduli limfatiċi (LNC) maqtugħa minn żewġ naħat permezz tal-metodu b’annimali individwali jew inkella, il-metodu bi gruppi ta’ trattament miġbura titħejja permezz ta’ diżaggregazzjoni mekkanika ħafifa minn ġo garża ta’ 200 micron-tal-azzar inossidabbli jew teknika aċċettabbli oħra għall-ġenerazzjoni ta’ sospensjoni ta’ ċellola waħda. L-LNC jinħaslu darbtejn b’eċċess ta’ PBS u d-DNA jiġi sseparat b’5 % aċidu trikloroaċetiku (TCA) f’4°C għal 18-il siegħa (3). Il-pelits jew jiġu sospiżi mill-ġdid f’1mL TCA u trasferiti f’kunjetti ta’ xintillazzjoni li jkun fihom 10mL ta’ likwidu ta’ xintillazzjoni għall-għadd ta’ ^{3}H, jew trasferiti direttament f’tubi għall-għadd tal-gamma għall-għadd ta’ ^{125}I.

Determinazzjoni tal-proliferazzjoni taċ-ċelloli (radjuattività inkorporata)

27. L-inkorporazzjoni ta’ ^{3}H-metiltimidin titkejjel bl-għadd ta’ xintillazzjoni β bħala diżintegrazzjonijiet kull minuta (DPM). L-inkorporazzjoni ta’ ^{125}I-jododeossiuridin titkejjel bl-għadd ta’ ^{125}I u hija espressa wkoll bħala DPM. Skont il-metodu użat, l-inkorporazzjoni hija espressa bħala DPM/ġurdien (metodu b’annimali individwali) jew DPM/grupp ta’ trattament (metodu bi gruppi ta’ trattament miġbura).

LLNA mnaqqas

28. F’ċerti sitwazzjonijiet, meta jkun hemm ħtieġa regolatorja li tkun ikkonfermata l-previżjoni negattiva tal-potenzjal ta’ sensitizzazzjoni tal-ġilda, jista’ jintuża protokoll fakultattiv ta’ rLLNA (16) (17) (18) b’inqas annimali, sakemm ikun hemm konformità mal-ispeċifikazzjonijiet l-oħrajn kollha tal-protokoll tal-LLNA f’dan it-TM. Qabel ma jiġi applikat l-approċċ ta’ rLLNA, għandhom jiġu pprovduti ġustifikazzjonijiet ċari u loġika xjentifika għall-użu tiegħu. Jekk jinkiseb riżultat pożittiv jew ekwivoku, jista’ jkun meħtieġ aktar ittestjar sabiex is-sejba tiġi interpretata jew iċċarata.

29. It-tnaqqis fl-għadd ta' gruppi ta' dożi huwa l-unika differenza bejn il-protokolli tal-metodi tat-testijiet LLNA u rLLNA u għal din ir-raġuni l-rLLNA ma tipprovdix informazzjoni dwar id-doża u r-reazzjoni. Għalhekk, l-rLLNA ma għandhiex tintuża meta tkun meħtieġa informazzjoni dwar id-doża u r-reazzjoni. Bħal-LLNA b'diversi dożi, il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test ivvalutata fl-rLLNA għandha tkun il-konċentrazzjoni massima li ma tikkawżax tossiċità sistemika evidenti u/jew irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda fil-ġurdien (ara l-paragrafu 18).

OSSERVAZZJONIJIET

Osservazzjonijiet kliniċi

30. Kull ġurdien għandu jkun osservat b'attenzjoni mill-inqas darba kuljum għal kwalunkwe sinjal kliniku, kemm ta' irritazzjoni lokali fil-post tal-applikazzjoni jew ta' tossiċità sistemika. L-osservazzjonijiet kollha jiġu rreġistrati b'mod sistematiku u jinżammu rekords għal kull ġurdien. Il-pjanijiet ta' sorveljanza għandhom jinkludu kriterji sabiex jiġu identifikati mill-ewwel dawk il-ġrieden li juru tossiċità sistemika, irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda, jew tmermir tal-ġilda għall-ewtanażja (37).

Piżijiet tal-ġisem

31. Kif iddikjarat fil-paragrafu 25, il-piżijiet tal-ġisem tal-annimali individwali għandhom jitkejlu fil-bidu tat-test u fil-qatla b'mod uman li tkun skedata.

KALKOLU TAR-RIŻULTATI

32. Ir-riżultati għal kull grupp ta' trattament huma espressi bħala l-SI. Meta jintuża l-metodu b'annimali individwali, l-SI jinstab billi wieħed jiddividi d-DPM/ġurdien medju f'kull grupp tas-sustanza tat-test, u l-grupp PC, bid-DPM/ġurdien medju għall-grupp tas-solvent/VC. L-SI medju għall-VCs imbagħad ikun wieħed. Meta jintuża l-metodu bi gruppi ta' trattament miġbura, l-SI jinstab billi wieħed jiddividi l-inkorporazzjoni radjuattiva miġbura għal kull grupp ta' trattament bl-inkorporazzjoni tal-grupp VC miġbur; dan jagħti SI medju.

33. Il-proċess ta' deċiżjoni jqis riżultat pożittiv meta l-SI ≥ 3. Madankollu, il-qawwa tad-doża-reazzjoni, is-sinifikat statistiku u l-konsistenza tas-solvent/mezz u r-reazzjonijiet tal-PC jistgħu jintużaw ukoll sabiex wieħed jiddetermina jekk riżultat marġinali jiġix iddikjarat pożittiv (4)(5)(6).

34. Jekk ikun jeħtieġ li jiġu ċċarati r-riżultati miksuba, għandhom jiġu kkunsidrati d-diversi karatteristiċi tas-sustanza tat-test, inkluż jekk għandhiex relazzjoni strutturali ma' sustanzi magħrufa li joħolqu sensitizzazzjoni fil-ġilda, jekk tikkawżax irritazzjoni lokali eċċessiva fil-ġilda tal-ġurdien, u n-natura tar-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni osservata. Dawn u kunsiderazzjonijiet oħrajn huma diskussi fid-dettall f'parti oħra (7).

35. Il-ġbir ta' dejta dwar ir-radjuattività fil-livell tal-ġurdien individwali jippermetti analiżi statistika għall-preżenza u l-grad ta' relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni fid-dejta. Kull evalwazzjoni statistika tista' tinkludi valutazzjoni tar-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni kif ukoll tqabbil aġġustat kif xieraq tal-gruppi tat-test (eż. grupp iddożat f'pari ma' tqabbil ta' VC simultanji). L-analiżijiet statistiċi jistgħu jinkludu, eż. regressjoni lineari jew it-test ta' William għall-evalwazzjoni tat-tendenzi tad-doża u tar-reazzjoni, u t-test ta' Dunnett għal tqabbil tal-pari. Meta jagħżel metodu xieraq għall-analiżi statistika, ir-riċerkatur għandu

jkun konxju mill-inugwaljanzi possibbli tad-differenzi u problemi oħrajn relatati li jistgħu jeħtieġu trasformazzjoni tad-dejta jew analiżi statistika mhux parametrika. Fi kwalunkwe każ ir-riċerkatur jista' jeħtieġ li jagħmel kalkoli tal-SI u analiżijiet statistiċi bi jew mingħajr ċerti punti ta' dejta (li xi drabi jissejħu "anomaliji" (outliers)).

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

36. Id-dejta għandha titqassar f'tabelli. Meta wieħed juża l-metodu b'annimali individwali, għandu juri l-valuri DPM tal-annimal individwali, il-medja DPM/annimal tal-grupp, it-terminu tal-iżball assoċjat tagħha (eż. SD, SEM), u l-SI medju għal kull grupp ta' doża meta mqabbel mal-grupp VC simultanju. Meta jintuża l-metodu bi gruppi ta' trattament miġbura, wieħed għandu juri l-medja tad-DPM u l-SI medju għal kull grupp ta' doża mqabbel mal-grupp VC simultanju.

Rapport tat-test

37. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanzi tat-test u ta' kontroll:

- dejta dwar l-identifikazzjoni (eż. in-numru tal-CAS u tal-KE, jekk disponibbli; is-sors; il-purità; l-impuritajiet magħrufa; in-numru tal-lott);
- in-natura fiżika u l-proprjetajiet fiżikokimiċi (*eż.* volatilità, stabbiltà, solubbiltà);
- f'każ ta' taħlita, il-kompożizzjoni u l-perċentwali relattivi tal-komponenti;

Solvent/mezz:

- dejta dwar l-identifikazzjoni (purità; konċentrazzjoni, fejn xieraq; il-volum użat);
- raġuni għall-għażla tal-mezz;

Annimali tat-test:

- is-sors tal-ġrieden CBA;
- stat mikrobijoloġiku tal-annimali, meta jkun magħruf;
- l-għadd u l-età tal-annimali;
- is-sors tal-annimali, il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ, id-dieta, eċċ.;

Kundizzjonijiet tat-test:

- dettalji dwar it-tħejjija u l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test;
- raġuni għall-għażla tad-doża (inklużi riżultati mit-test ta' qabel l-iskrinjar, jekk ikun sar);
- il-konċentrazzjonijiet tal-mezz u tas-sustanza tat-test użati, u l-ammont totali tas-sustanza tat-test applikata;
- dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma (inkluż it-tip/is-sors tad-dieta, is-sors tal-ilma);
- dettalji dwar l-iskedi tat-trattament u tat-teħid ta' kampjuni;
- metodi ta' kejl tat-tossiċità;

- kriterji li ntużaw sabiex l-istudji jiġu kkunsidrati pożittivi jew negattivi;
- dettalji dwar kwalunkwe devjazzjoni mill-protokoll u spjegazzjoni dwar kif id-devjazzjoni taffettwa d-disinn u r-riżultati tal-istudju;

Kontroll tal-affidabbiltà:

- sommarju tar-riżultati tal-aħħar kontroll tal-affidabbiltà, inkluża informazzjoni dwar is-sustanza tat-test, il-konċentrazzjoni u l-mezz użat;
- dejta dwar PC simultanju u/jew storiku u dwar NC simultanju għal-laboratorju li qed jagħmel it-test;
- jekk ma kienx inkluż PC simultanju, id-dejta u r-rapport tal-laboratorju għall-aktar PC perjodiku reċenti u rapport li jagħti dettalji dwar id-dejta tal-PC storiku għal-laboratorju li jiġġustifika l-bażi għaliex ma sarx PC simultanju;

Riżultati:

- piżijiet individwali tal-ġrieden fil-bidu tad-dożar u mal-qatla skedata; kif ukoll il-medja u t-terminu ta' żball assoċjat (eż. SD, SEM) għal kull grupp ta' trattament;
- il-ħin tal-bidu u tas-sinjali ta' tossiċità, inkluża l-irritazzjoni tal-ġilda fil-post fejn ingħatat id-doża, jekk ikun hemm, għal kull annimal;
- tabella tal-valuri DPM u tal-valuri SI għal kull ġurdien (metodu b'annimali individwali) jew medji (metodu bi gruppi ta' trattament miġbura) għal kull grupp ta' trattament;
- il-medja u t-terminu ta' żball assoċjat (eż. SD, SEM) għad-DPM/ġurdien għal kull grupp ta' trattament u r-riżultati tal-analiżi tal-anomaliji għal kull grupp ta' trattament meta jintuża l-metodu b'annimali individwali;
- l-SI kkalkulat u kejl xieraq ta' varjabbiltà li jikkunsidra l-varjabbiltà bejn l-annimali kemm fis-sustanza tat-test kif ukoll fil-gruppi ta' kontroll meta jintuża l-metodu b'annimali individwali;
- ir-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni;
- analiżijiet statistiċi, fejn xieraq;

Diskussjoni tar-riżultati:

- kumment qasir dwar ir-riżultati, l-analiżi tad-doża u r-reazzjoni, u analiżijiet statistiċi, fejn xieraq, b'konklużjoni dwar jekk is-sustanza tat-test għandhiex titqies li tikkawża s-sensitizzazzjoni tal-ġilda.

LETTERATURA

(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/LLNAPerfStds.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/fcLLNA/BRDcomplete.pdf]

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.

(35) OECD (1987*), Acute Dermal Toxicity,* OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. 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]

Appendiċi 1

STANDARDS TAL-PRESTAZZJONI GĦALL-VALUTAZZJONI TA' METODI TA' TTESTJAR LLNA (LOCAL LYMPH NODE ASSAY) SIMILI JEW MODIFIKATI GĦAS-SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA

INTRODUZZJONI

1. L-għan tal-Istandards tal-Prestazzjoni (Performance Standards, PS) huwa li jikkomunikaw il-bażi li fuqha l-metodi ta' ttestjar, kemm ta' speċjalità (jiġifieri bid-dritt tal-awtur, bil-marka kummerċjali, irreġistrati) kif ukoll ġeneriċi jistgħu jiġu ddeterminati li għandhom biżżejjed preċiżjoni u affidabbiltà għal raġunijiet speċifiċi ta' ttestjar. Dawn il-PS, ibbażati fuq metodi ta' ttestjar validati u aċċettati, jistgħu jintużaw sabiex jevalwaw l-affidabbiltà u l-preċiżjoni ta' metodi simili oħra (li fil-lingwaġġ tat-taħdit komuni jissejħu testijiet "me-too") li huma bbażati fuq prinċipji xjentifiċi simili u sabiex ikejlu jew ibassru l-istess effett bijoloġiku jew tossiku (14).

2. Qabel l-adozzjoni tal-metodi modifikati (jiġifieri, titjib potenzjali propost għal metodu ta' ttestjar approvat), għandu jkun hemm evalwazzjoni sabiex jiġi ddeterminat l-effett tal-bidliet proposti fuq il-prestazzjoni tat-test u sa fejn dawn il-bidliet jaffettwaw l-informazzjoni disponibbli għall-komponenti l-oħra tal-proċess ta' validazzjoni. Skont l-għadd u t-tip ta' bidliet proposti, id-dejta u d-dokumentazzjoni ta' prova ġġenerati għal dawk il-bidliet, dawn għandhom ikunu jew soġġetti għall-istess proċess ta' validazzjoni kif spjegat għal test ġdid, jew, jekk dan ikun xieraq, għal valutazzjoni limitata ta' affidabbiltà u rilevanza billi jintużaw il-PS stabbiliti (14).

3. Metodi simili jew modifikati proposti għall-użu f'dan it-TM (Test Method) għandhom jiġu evalwati sabiex jiġu ddeterminati l-affidabbiltà u l-preċiżjoni tagħhom billi jintużaw sustanzi kimiċi li jirrappreżentaw il-firxa sħiħa tar-riżultati tal-LLNA. Sabiex jiġi evitat l-użu mhux neċessarju ta' annimali, huwa ferm rakkomandat li l-iżviluppaturi tal-mudell jikkonsultaw lill-awtoritajiet xierqa qabel ma jibdew l-istudji ta' validazzjoni, f'konformità mal-PS u l-gwida pprovduti f'dan it-TM.

4. Dawn il-PS huma bbażati fuq il-PS (12) armonizzati tal-US-ICCVAM, l-EC-ECVAM u l-JaCVAM-Ġappuniż, sabiex jiġu vvalidati verżjonijiet simili jew modifikati tal-LLNA. Il-PS jikkonsistu fil-komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar, is-sustanzi ta' referenza rakkomandati u l-istandards għall-preċiżjoni u l-affidabbiltà li l-metodu propost għandu jilħaq jew jaqbeż.

I. Komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar

5. Sabiex jiġi żgurat li metodu tal-LLNA simili jew modifikat huwa analogu b'mod funzjonali u mekkanistiku għal-LLNA u jkejjel l-istess effett bijoloġiku, il-komponenti li ġejjin għandhom jiġu inklużi fil-protokoll tal-metodu ta' ttestjar:

- Is-sustanza tat-test għandha tiġi applikata b'mod topiku fuq iż-żewġ widnejn tal-ġurdien;
- Il-proliferazzjoni tal-limfoċiti għandha titkejjel fin-nodi limfatiċi li jkunu qed inixxu mill-post tal-applikazzjoni tas-sustanza tat-test;

- Il-proliferazzjoni tal-limfoċiti għandha titkejjel waqt il-fażi ta' induzzjoni ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda;

- Għas-sustanzi tat-test, l-ogħla doża magħżula għandha tkun il-konċentrazzjoni massima li ma tipprovokax tossiċità sistemika u/jew irritazzjoni eċċessiva tal-ġilda lokali fil-ġurdien. Għal sustanzi kimiċi ta' referenza pożittivi, bħala minimu, l-ogħla doża għandha tkun għolja daqs il-valuri tal-EC3 (Konċentrazzjoni Stmata 3) tal-LLNA tas-sustanzi kimiċi ta' referenza korrispondenti (ara t-Tabella 1) mingħajr ma tiġi prodotta tossiċità sistemika u/jew irritazzjoni eċċessiva tal-ġilda lokali tal-ġurdien;

- VC simultanju għandu jiġu inkluż f'kull studju u, fejn xieraq, għandu jintuża PC simultanju wkoll;

- Għandu jintuża minimu ta' erba' annimali għal kull grupp ta' dożi;

- Tista' tingħabar dejta individwali jew inkella fi grupp dwar l-annimali.

F'każ li ma jintlaħaqx xi wieħed minn dawn il-kriterji, dawn il-PS ma jistgħux jintużaw għall-validazzjoni ta' metodu simili jew modifikat.

<u>II. Lista minima ta' sustanzi kimiċi ta' referenza</u>

6. Il-PS (12) armonizzati tal-US-ICCVAM, l-EC-ECVAM u l-JaCVAM-Ġappuniż identifikaw 18-il sustanza kimika ta' referenza minimi li għandhom jintużaw u erba' sustanzi kimiċi ta' referenza fakultattivi (jiġifieri sustanzi li jew ipproduċew riżultati pożittivi foloz jew inkella negattivi foloz fl-LLNA, meta mqabbla ma' riżultati fuq il-bnedim u fuq fniek tal-Indi (B.6, jew il-Linja Gwida 406 tat-Test tal-OECD) (13), u għaldaqstant, jipprovdu l-opportunità li tintwera prestazzjoni tajba daqs l-LLNA jew aħjar) li huma inklużi fil-PS tal-LLNA. Il-kriterji tal-għażla għall-identifikazzjoni ta' dawn is-sustanzi kimiċi kienu:

- Il-lista ta' referenza tas-sustanzi kimiċi rrappreżentat it-tipi ta' sustanzi tipikament ittestjati għall-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda u għall-firxa ta' reazzjonijiet li l-LLNA kapaċi jkejjel jew ibassar;
- Is-sustanzi kellhom strutturi kimiċi definiti sew;
- Id-dejta tal-LLNA minn testijiet fuq ħnieżer tal-Indi (jiġifieri B.6; il-Linja Gwida 406 tat-Test tal-OECD) (13) u (fejn possibbli) id-dejta mill-bnedmin kienet disponibbli għal kull sustanza; u
- Is-sustanzi kienu disponibbli minn sors kummerċjali.

Is-sustanzi kimiċi ta' referenza rakkomandati huma elenkati fit-Tabella 1. L-istudji li jużaw is-sustanzi kimiċi ta' referenza proposti għandhom jiġu evalwati fil-mezz li huma elenkati miegħu fit-Tabella 1. Fis-sitwazzjonijiet fejn sustanza elenkata ma tistax tkun disponibbli, jistgħu jintużaw sustanzi oħra li jissodisfaw il-kriterji tal-għażla msemmija, b'ġustifikazzjoni adegwata.

TABELLA 1: SUSTANZI KIMIĊI TA' REFERENZA RAKKOMANDATI GĦALL-PS TAL-LLNA.

Numru	Sustanzi kimiċi[1]	Nru tal-CAS	Forma	Mezz[2]	EC3 %[3]	N[4]	0.5x - 2.0x EC3	Firxa attwali tal-EC3	LLNA vs. Fenek tal-Indi	LLNA vs. Bniedem
1	5-Kloro-2-metil-4-isotijażolin-3-on (CMI)/ 2-metil-4-isotijażolin-3-on (MI)[5]	26172-55-4/ 2682-20-4	Lik	DMF	0.009	1	0.0045-0.018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sol	AOO	0.049	15	0.025-0.099	0.02-0.094	+/+	+/+
3	4-Fenilendiammina	106-50-3	Sol	AOO	0.11	6	0.055-0.22	0.07-0.16	+/+	+/+
4	Klorur tal-kobalt	7646-79-9	Sol	DMSO	0.6	2	0.3-1.2	0.4-0.8	+/+	+/+
5	Isoewġenol	97-54-1	Lik	AOO	1.5	47	0.77-3.1	0.5-3.3	+/+	+/+
6	2-Merkaptobenżotijażol	149-30-4	Sol	DMF	1.7	1	0.85-3.4	NC	+/+	+/+
7	Ċitral	5392-40-5	Lik	AOO	9.2	6	4.6-18.3	5.1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Lik	AOO	9.7	21	4.8-19.5	4.4-14.7	+/+	+/+
9	Ewġenol	97-53-0	Lik	AOO	10.1	11	5.05-20.2	4.9-15	+/+	+/+
10	Fenilbenżoat	93-99-2	Sol	AOO	13.6	3	6.8-27.2	1.2-20	+/+	+/+
11	Alkoħol ċinnamiku	104-54-1	Sol	AOO	21	1	10.5-42	NC	+/+	+/+
12	Urea tal-imidażolidinil	39236-46-9	Sol	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	Metakrilat tal-metil	80-62-6	Lik	AOO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	Klorobenżen	108-90-7	Lik	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/*
15	Isopropanol	67-63-0	Lik	AOO	50	1	NA	NA	-/-	-/+
16	Aċidu lattiku	50-21-5	Lik	DMSO	25	1	NA	NA	-/-	-/*
17	Saliċilat tal-metil	119-36-8	Lik	AOO	20	9	NA	NA	-/-	-/-
18	Aċidu saliċiliku	69-72-7	Sol	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/-

Numru	Sustanzi kimiċi[1]	Nru tal-CAS	Forma	Mezz[2]	EC3 %[3]	N[4]	0.5x - 2.0x EC3	Firxa attwali tal-EC3	LLNA vs. Fenek tal-Indi	LLNA vs. Bniedem
Sustanzi fakultattivi sabiex Tintwera Prestazzjoni Mtejba Relatata mal-LLNA										
19	Sodju lauril sulfat	151-21-3	Sol	DMF	8.1	5	4.05-16.2	1.5-17.1	+/-	+/-
20	Dimetakrilat tal-etilen glikol	97-90-5	Lik	MEK	28	1	14-56	NC	+/-	+/+
21	Ksilen	1330-20-7	Lik	AOO	95.8	1	47.9-100	NC	+/**	+/-
22	Klorur tan-nikil	7718-54-9	Sol	DMSO	5	2	NA	NA	-/+	-/+

Taqsiriet: AOO = aċetun: żejt taż-żebbuġa (4:1, v/v); Nru tal-CAS = Numru tal-Chemical Abstracts Service; DMF = N,N-dimetilformammid; DMSO = dimetil sulfossidu; DNCB = 2,4-dinitroklorobenżen; EC3 = stima ta' konċentrazzjoni meħtieġa sabiex jiġi prodott indiċi ta' stimolazzjoni ta' 3; GP = riżultat tat-test fuq il-fenek tal-Indi (jiġifieri B. 6 jew il-Linja Gwida 406 tat-Test tal-OECD) (13); HCA = eżil ċinnamaldeid; Lik = likwida; LLNA = riżultat tal-Analiżi tan-Nodula tal-Limfa Lokali tal-ġrieden (jiġifieri B. 42 jew il-Linja Gwida 429 tat-Test tal-OECD) (1); MEK = metil etil keton; NA = mhux applikabbli peress li l-indiċi ta' stimulazzjoni huwa ta' <3; NC = mhux ikkalkolata peress li d-dejta nkisbet minn studju wieħed; Sol = solida; Veh = mezz tat-test.

[1] Is-sustanzi kimiċi għandhom jitħejjew ta' kuljum sakemm id-dejta ta' stabbiltà ma turix l-aċċettabilità tal-ħżin.

[2] Minħabba l-impatt potenzjali ta' mezzi differenti fuq il-prestazzjoni tal-LLNA, għandu jintuża l-mezz rakkomandat għal kull sustanza kimika ta' referenza (24) (32).

[3] Il-valur medju fejn kien hemm disponibbli aktar minn valur wieħed tal-EC3. Għal sustanzi negattivi (jiġifieri bl-indiċi ta' stimolazzjoni <3), hija pprovduta l-ogħla konċentrazzjoni ttestjata.

[4] Għadd ta' studji tal-LLNA li minnhom inkisbet id-dejta.

[5] Kummerċjalment disponibbli bħala Kathon CG (Nru tal-CAS 55965-84-9), li hija taħlita ta' 3:1 ta' CMI u MI. Il-konċentrazzjonijiet relattivi ta' kull firxa ta' komponenti minn 1.1 % sa 1.25 % (CMI) u 0.3 % sa 0.45 % (MI). Il-komponenti inattivi huma sustanzi tal-melħ tal-manjeżju (21.5 % sa 24 %) u nitrat tar-ram (0.15 % sa 0.17 %), bil-formulazzjoni li jifdal ta' 74 % sa 77 % ilma. Kathon CG hija disponibbli minnufih mingħand Sigma-Aldrich u Rohm and Haas (issa, Dow Chemical Corporation).

* = Ġie supponut li s-sustanza mhijiex sensitizzatur fil-bnedmin minħabba l-fatt li ma nstabu l-ebda riżultati mit-test kliniku bl-impjastri (clinical patch test), mhijiex inkluża bħala allerġen fis-sett tat-test bl-impjastri, u ma nstabu l-ebda rapporti ta' każijiet ta' sensitizzazzjoni fil-bnedmin.

** = Mhijiex disponibbli d-dejta mill-GP (fenek tal-Indi).

III. Standards ta' affidabbiltà u preċiżjoni ddefiniti

7. Il-preċiżjoni ta' metodu LLNA simili jew modifikat għandha tissodisfa jew taqbeż dik tal-PS tal-LLNA meta dan jiġi evalwat permezz tat-18-il sustanza kimika ta' referenza minimi li għandhom jintużaw. Il-metodu l-ġdid jew modifikat għandu jirriżulta fil-klassifikazzjoni korretta fuq il-bażi ta' deċiżjoni ta' "iva jew le". Madankollu, il-metodu l-ġdid jew modifikat jista' ma jikklassifikax b'mod korrett is-sustanzi kimiċi ta' referenza minimi kollha li għandhom jintużaw. Jekk, pereżempju, wieħed mis-sensitizzaturi dgħajfa jiġi kklassifikat ħażin, tista' titqies raġuni għall-klassifikazzjoni żbaljata u dejta addizzjonali adattata (pereżempju riżultati tat-test li jipprovdu klassifikazzjonijiet korretti għal sustanzi oħra b'karatteristiċi fiżiċi, kimiċi u sensitizzanti simili għal dawk tas-sustanza kimika ta' referenza klassifikata ħażin) sabiex tintwera prestazzjoni ekwivalenti. F'dawn iċ-ċirkostanzi, l-istatus ta' validazzjoni tal-metodu ta' ttestjar LLNA l-ġdid jew modifikat jiġi evalwat każ b'każ.

Riproduċibbiltà intralaboratorja

8. Sabiex tiġi stabbilita r-riproduċibbiltà intralaboratorja, metodu LLNA ġdid jew modifikat għandu jiġi eżaminat billi tintuża sustanza sensitizzanti li hija karatterizzata sew fl-LLNA. Għaldaqstant, il-PS tal-LLNA huma bbażati fuq il-varjabbiltà tar-riżultati minn testijiet ripetuti ta' eżil ċinnamaldeid (HCA). Sabiex tiġi eżaminata l-affidabbiltà intralaboratorja, il-limitu stmat ta' konċentrazzjoni (ECt – treshold Estimated Concentration) għall-HCA għandhom jinġiebu minn erba' okkażjonijiet separati tal-inqas b'ġimgħa bejn it-testijiet. Riproduċibbiltà intralaboratorja aċċettabbli hija indikata mill-abbiltà tal-laboratorju li f'kull test tal-HCA jikseb il-valuri tal-ECt ta' bejn 5 % u 20 %, li jirrappreżentaw il-firxa ta' 0.5-2.0 darbiet l-EC3 medja speċifikata għall-HCA (10 %) fl-LLNA (ara t-Tabella 1).

Riproduċibbiltà interlaboratorja

9. Ir-riproduċibbiltà interlaboratorja ta' metodu LLNA ġdid jew modifikat għandha tiġi eżaminata billi jintużaw żewġ sustanzi sensitizzanti li huma karatterizzati sew fl-LLNA. Il-PS tal-LLNA huma bbażati fuq il-varjabbiltà tar-riżultati minn testijiet tal-HCA u 2,4-dinitroklorobenżen (DNCB) f'laboratorji differenti. Il-valuri tal-ECt għandhom jinġiebu b'mod indipendenti minn studju wieħed imwettaq tal-inqas fi tliet laboratorji separati. Sabiex tintwera r-riproduċibbiltà interlaboratorja aċċettabbli, kull laboratorju għandu jikseb il-valuri tal-ECt ta' 5 % sa 20 % għall-HCA u ta' 0.025 % sa 0.1 % għad-DNCB, li jirrappreżentaw il-medja ta' 0.5-2.0 darbiet il-konċentrazzjonijiet medji tal-EC3 speċifikati għall-HCA (10 %) u d-DNCB (0.05 %), rispettivament, fl-LLNA (ara t-Tabella 1).

Appendiċi 2

DEFINIZZJONIJIET

Preċiżjoni: Il-viċinanza tal-qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri ta' referenza aċċettati. Hija miżura ta' prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u aspett wieħed ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (14).

Sustanza ta' riferiment: Sustanza sensitizzanti jew mhux sensitizzanti użata bħala standard għat-tqabbil ma' sustanza tat-test. Is-sustanza ta' riferiment għandu jkollha l-karatteristiċi li ġejjin; (i) sors(i) konsistenti u affidabbli; (ii) similarità strutturali u funzjonali għall-klassi ta' sustanzi li jkunu qed jiġu ttestjati; (iii) karatteristiċi fiżikokimiċi magħrufa; (iv) dejta ta' appoġġ dwar effetti magħrufa, u (v) potenza magħrufa fil-firxa ta' rispons mixtieq.

Limitu stmat ta' konċentrazzjoni (ECt): Konċentrazzjoni stmata ta' sustanza tat-test meħtieġa sabiex jiġi prodott indiċi ta' stimolazzjoni li huwa indikattiv ta' rispons pożittiv.

Konċentrazzjoni stmata ta' tlieta (EC3): Konċentrazzjoni stmata ta' sustanza tat-test meħtieġa sabiex jiġi prodott indiċi ta' stimolazzjoni ta' tlieta.

Negattiv falz: Sustanza tat-test identifikata ħażin bħala negattiva jew mhux attiva b'metodu ta' ttestjar, meta fil-fatt hija pożittiva jew attiva.

Pożittiv falz: Sustanza tat-test identifikata ħażin bħala pożittiva jew attiva minn test, meta fil-fatt hija negattiva jew mhux attiva.

Periklu: Il-potenzjal għal effett avvers għas-saħħa jew għall-ambjent. L-effett avvers jidher biss jekk hemm esponiment ta' livell suffiċjenti.

Riproduċibbiltà interlaboratorja: Kejl sa fejn il-laboratorji kwalifikati differenti, li jużaw l-istess protokoll u li jittestjaw l-istess sustanzi tat-test, jistgħu jipproduċu riżultati li huma simili b'mod kwalitattiv u kwantitattiv. Ir-riproduċibbiltà interlaboratorja hija ddeterminata matul il-proċessi ta' validazzjoni u ta' validazzjoni minn qabel, u tindika sa fejn test jista' jiġi trasferit b'suċċess bejn laboratorji, u tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà bejn laboratorji (14).

Riproduċibbiltà intralaboratorja: Determinazzjoni ta' kemm il-persuni kwalifikati fi ħdan l-istess laboratorju jista' jirnexxilhom jirreplikaw ir-riżultati billi jużaw protokoll speċifiku fi żminijiet differenti. Din tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà fi ħdan il-laboratorju (14).

Test "me-too": Espressjoni li tingħad fit-taħdit komuni għal metodu ta' ttestjar li huwa strutturalment u funzjonalment simili għal metodu ta' ttestjar ta' referenza validat u aċċettat. Metodu ta' ttestjar bħal dan ikun kandidat għal validazzjoni rapida ("catch-up validation"). Jintuża b'mod alternanti ma' metodu ta' ttestjar simili (14).

Outlier: Outlier hija osservazzjoni li hija mmarkata differenti minn valuri oħra f'kampjun aleatorju minn popolazzjoni.

Standards ta' Prestazzjoni (PS): Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validu, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' metodu ta' ttestjar propost li huwa

simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Hemm inklużi; (i) komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar; (ii) lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati sabiex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (iii) il-livelli simili ta' preċiżjoni u affidabbiltà, ibbażati fuq x'inkiseb għall-metodu ta' ttestjar validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta jiġi evalwat billi tintuża l-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza (14).

Metodu ta' ttestjar ta' speċjalità: Metodu ta' ttestjar li l-manifattura u d-distribuzzjoni tiegħu huma ristretti minn privattivi, drittijiet tal-awtur, marki kummerċjali, eċċ.

Garanzija tal-kwalità: Proċess ta' ġestjoni li skontu jiġu vvalutati l-aderenza mal-istandards ta' ttestjar tal-laboratorji, ir-rekwiżiti u l-proċeduri ta' żamma tar-rekords u l-preċiżjoni tat-trasferiment tad-dejta minn individwi li huma indipendenti minn dawk li jwettqu l-ittestjar.

Sustanzi kimiċi ta' referenza: Sustanzi kimiċi magħżula għall-użu fil-proċess ta' validazzjoni, li għalihom huma diġà magħrufa r-reazzjonijiet fis-sistema ta' ttestjar ta' referenza *in vitro* jew *in vivo* jew l-ispeċi ta' interess. Dawn is-sustanzi kimiċi għandhom ikunu rappreżentanti tal-klassijiet ta' sustanzi kimiċi li għalihom huwa mistenni jintuża l-metodu ta' ttestjar, u dawn għandhom jirrappreżentaw il-firxa sħiħa ta' reazzjonijiet li jistgħu jkunu mistennija mis-sustanzi kimiċi li għalihom huwa mistenni li jintuża dan il-metodu ta' ttestjar, minn qawwija, għal dgħajfa, sa negattivi. Settijiet differenti ta' sustanzi kimiċi ta' referenza jistgħu jkunu meħtieġa għall-istadji differenti tal-proċess ta' validazzjoni, u għal metodi ta' ttestjar u użi tat-testijiet differenti (14).

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test għall-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-konsiderazzjoni tal-preċiżjon (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (14).

Affidabbiltà: Kejl li jiddetermina kemm il-metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fi ħdan u bejn il-laboratorji maż-żmien, meta dan jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din hija eżaminata billi tiġi kkalkolata r-riproduċibbiltà intralaboratorja u dik interlaboratorja (14).

Sensitizzazzjoni tal-ġilda: Proċess immunoloġiku li jitfaċċa meta individwu suxxettibbli jkun espost b'mod topiku għal allerġen kimiku induttur, li jipprovoka rispons immuni fil-ġilda li jista' jwassal għall-iżvilupp ta' sensitizzazzjoni mal-kuntatt.

Indiċi ta' Stimolazzjoni (SI): Valur ikkalkolat sabiex jeżamina l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' sustanza tat-test li huwa l-proporzjon tal-proliferazzjoni fil-gruppi ttrattati għal dik fil-grupp ta' kontroll ta' mezz simultanju.

Sustanza tat-test (li hija msemmija wkoll sustanza kimika tat-test): Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan it-TM.

Metodu ta' ttestjar validat: Metodu ta' ttestjar li għalih tlestew studji ta' validazzjoni sabiex jiġu ddeterminati r-rilevanza (inkluża l-preċiżjoni) u l-affidabbiltà għal skop speċifiku. Huwa importanti li jiġi osservat li metodu ta' ttestjar validat jista' ma jkollux prestazzjoni suffiċjenti f'termini ta' preċiżjoni u affidabbiltà sabiex jitqies aċċettabbli għall-iskop propost (14)."

2. Il-Kapitolu B.46 huwa mibdul b'li ġej:

"B.46 Irritazzjoni tal-Ġilda *In Vitro*: Metodu ta' Ttestjar tal-Epidermide Umana Rikostruwita

INTRODUZZJONI

1. Irritazzjoni tal-ġilda tirreferi għall-produzzjoni ta' ħsara riversibbli fil-ġilda wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test għal massimu ta' 4 sigħat [kif iddefinit mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS - Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU) u mir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet (1)(3)]. Dan il-Metodu ta' Ttestjar (TM) jipprovdi proċedura *in vitro* li tista' tintuża għall-identifikazzjoni tal-periklu ta' sustanzi kimiċi irritanti (sustanzi u taħlitiet) f'konformità mal-GHS tan-NU u l-Kategorija 2 tas-CLP tal-UE (1) (2) (3). Fl-UE u f'reġjuni oħra, li ma adottawx il-Kategorija 3 (sustanzi irritanti minuri) tal-GHS tan-NU, dan it-TM jista' jintuża wkoll sabiex jidentifika sustanzi kimiċi mhux klassifikati, jiġifieri dawk ta' "L-Ebda Kategorija" fil-GHS tan-NU u fis-CLP tal-UE (1)(3). Dan it-TM jista' jintuża sabiex jiddetermina l-irritazzjoni fuq il-ġilda tas-sustanzi kimiċi bħala test sostitut waħdieni għall-ittestjar ta' irritazzjoni tal-ġilda *in vivo* fi ħdan strateġija ta' ttestjar imtarrġa (il-Kapitolu 4 u l-Kapitolu B.4 f'dan l-Anness).

2. Ġeneralment, il-valutazzjoni tal-irritazzjoni tal-ġilda kienet tinvolvi l-użu tal-annimali tal-laboratorju [il-Linja Gwida 404 tat-Test tal-OECD; il-Kapitolu B.4 f'dan l-Anness] (4). Fir-rigward tal-kwistjonijiet relatati mal-benesseri tal-annimali, il-B.4 ġie rivedut fl-2004 u sar jippermetti li tiġi ddeterminata l-korrużjoni/irritazzjoni tal-ġilda billi tiġi applikata strateġija ta' ttestjar imtarrġa, billi jintużaw metodi ta' ttestjar *in vitro* jew *ex vivo*, u għalhekk jiġu evitati l-uġigħ u t-tbatija tal-annimali. Tliet metodi ta' ttestjar *in vitro* validati ġew adottati bħala Linji Gwida 430, 431 u 435 (5) (6) (7) tat-Test tal-OECD u tnejn minnhom bħala l-Kapitoli B.40 u B.40bis ta' dan l-Anness, li għandhom jintużaw għall-parti korruživa tal-istrateġija ta' ttestjar imtarrġa tal-B.4 jew tal-Linja Gwida (4) tat-Test tal-OECD.

3. Dan it-TM jindirizza l-irritazzjoni tal-ġilda tal-punt tat-tmiem tas-saħħa umana. Huwa bbażat fuq epidermide umana rikostruwita (RhE - Reconstructed human Epidermis), li fid-disinn globali tagħha (l-użu tal-keratinoċiti mhux trasformati mnissla mill-epidermide umana bħala sors taċ-ċelloli u l-użu ta' tessut u ċitoarkitettura rappreżentattivi) tixbah ħafna lill-karatteristiċi bijokimiċi u fiżjoloġiċi tas-saffi tal-wiċċ tal-ġilda umana, jiġifieri l-epidermide. Dan it-TM jinkludi wkoll sett ta' Standards ta' Prestazzjoni (Appendiċi 2) għall-valutazzjoni ta' metodi simili u modifikati bbażati fuq l-RhE żviluppati mill-EC-ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) (8), f'konformità mal-prinċipji tad-Dokument ta' Gwida Nru 34 tal-OECD (9).

4. Hemm tliet metodi validati li jaderixxu ma' dan it-TM. L-istudji ta' prevalidazzjoni, l-ottimizzazzjoni u l-validazzjoni tlestew għal metodu *in vitro* (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), li jużaw mudell tal-RhE, disponibbli kummerċjalment bħala EpiSkin™ (iddeżinjat il-Metodu ta' Referenza Validat – VRM - Validated Reference Method). Żewġ metodi oħra tal-RhE kummerċjalment disponibbli ta' irritazzjoni tal-ġilda *in vitro* wrew riżultati simili għall-VRM skont il-validazzjoni bbażata fuq il-PS (21), u dawn huma l-metodi ta' EpiDerm™ SIT (EPI-200) u ta' SkinEthic™ RHE (22).

5. Qabel ma jkun jista' jintuża metodu RhE *in vitro* simili jew modifikat propost għajr il-metodi tal-RHE ta' VRM, ta' EpiDerm™ SIT (EPI-200) jew ta' SkinEthic™ RHE għal skopijiet regolatorji, għandhom jiġu stabbiliti l-affidabbiltà, ir-rilevanza (preċiżjoni) u l-limitazzjonijiet tiegħu għall-użu maħsub sabiex jiġi żgurat li dan jista' jitqies bħala wieħed simili għal dak tal-VRM, skont ir-rekwiżiti tal-PS stabbiliti f'dan it-TM (Appendiċi 2). Barra minn hekk, huwa rakkomandat li jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Sfond ta' Spjegazzjoni tal-OECD dwar l-ittestjar ta' irritazzjoni tal-ġilda *in vitro* qabel l-iżvilupp u l-validazzjoni ta' metodu RhE *in vitro* simili jew modifikat u qabel ma dan jiġi sottomess għal adozzjoni regolatorja (23).

DEFINIZZJONIJIET

6. Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

7. Limitazzjoni tat-TM, kif muri mill-istudju ta' validazzjoni (16), huwa li dan ma jippermettix il-klassifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi għall-Kategorija 3 (sustanzi irritanti minuri) fakultattiva tal-GHS tan-NU (1). Meta jintuża bħala test sostitut parzjali, jista' jkun meħtieġ ittestjar *in vivo* ta' segwitu sabiex jiġi karatterizzat il-potenzjal sħiħ ta' irritazzjoni tal-ġilda (il-Kapitolu 4 u l-Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness). Huwa rikonoxxut li l-użu ta' ġilda umana huwa soġġett għal kunsiderazzjonijiet u kundizzjonijiet etiċi nazzjonali u internazzjonali.

8. Dan it-TM jindirizza l-komponent ta' irritazzjoni tal-ġilda *in vitro* tal-istrateġija ta' ttestjar imtarrġa tal-B.4 (Il-Linja Gwida 404 tat-Test tal-OECD) dwar l-irritazzjoni/il-korrużjoni dermali (4). Filwaqt li dan it-TM ma jipprovdix informazzjoni adegwata dwar il-korrużjoni tal-ġilda, għandu jiġi nnotat li l-B.40 bis (Linja Gwida 431 tat-Test tal-OECD) dwar il-korrużjoni tal-ġilda huwa bbażat fuq l-istess sistema ta' ttestjar tal-RhE, għad li juża protokoll ieħor (il-Kapitolu B.40 bis). Dan il-metodu huwa bbażat fuq il-mudelli tal-RhE billi jintużaw keratinoċiti umani, li għaldaqstant jirrappreżenta b'mod *in vitro* l-organu fil-mira tal-ispeċi ta' interess. Barra minn hekk, dan ikopri direttament il-pass inizjali tal-katina/mekkaniżmu infjammatorja/u tal-azzjoni (ħsara liċ-ċelloli u lit-tessut li tirriżulta fi trawma lokalizzata) li sseħħ/jseħħ waqt l-irritazzjoni *in vivo*. Ġiet ittestjata firxa wiesgħa ta' sustanzi kimiċi fil-validazzjoni li hija l-bażi ta' dan it-TM u l-bażi ta' dejta empirika tal-istudju ta' validazzjoni kienet tammonta għal total ta' 58 sustanza kimika (16)(18)(23). Huwa applikabbli għal solidi, likwidi, semisolidi u xama'. Il-likwidi jistgħu jkunu milwiema jew mhux milwiema; is-solidi jistgħu jkunu jinħallu jew ma jinħallux fl-ilma. Kull meta dan ikun possibbli, is-solidi għandhom jintaħnu fi trab fin qabel l-applikazzoni; mhuwa meħtieġ l-ebda trattament minn qabel tal-kampjun. Il-gassijiet u l-aerosols għadhom ma ġewx eżaminati fi studju ta' validazzjoni (24). Filwaqt li huwa mifhum li dawn jistgħu jiġu ttestjati billi tintuża t-teknoloġija tal-RhE, it-TM attwali ma jippermettix l-ittestjar ta' gassijiet u aerosols. Għandu jiġi nnotat ukoll li sustanzi kimiċi ferm ikkuluriti jistgħu jinterferixxu mal-kejl tal-vijabbiltà taċ-ċellola u jeħtieġu l-użu ta' kontrolli adattati għal korrezzjonijiet (ara l-paragrafi 24-26).

9. Sessjoni waħda ta' ttestjar magħmula minn tliet tessuti replikati għandha tkun biżżejjed għal sustanza kimika tat-test meta l-klassifikazzjoni tkun inekwivokabbli. Madankollu, f'każijiet ta' riżultati li joqorbu ħafna lejn il-limitu, bħal pereżempju kejl replikat mhux konkordanti u/jew vijabbiltà tal-perċentwal medju daqs 50 ± 5 %, għandha tiġi kkunsidrata t-tieni sessjoni, kif ukoll it-tielet waħda f'każ ta' riżultati mhux konkordanti bejn l-ewwel żewġ sessjonijiet.

PRINĊIPJU TAT-TEST

10. Is-sustanza kimika tat-test hija applikata b'mod topiku għal mudell tal-RhE tridimensjonali, ifformata minn keratinoċiti mhux trasformati mnissla mill-epidermide umana, li ffurmaw ruħhom f'mudell b'diversi saffi, ferm differenzjat ta' *epidermide* umana. Din tikkonsisti f'saff tal-qiegħ, saff spinuż u saff granulari organizzati, u *stratum corneum* b'diversi saffi li jkun fih saffi lipidi lamellari interċellolari li jirrappreżentaw il-klassijiet lipidi ewlenin b'mod analogu għal dawk li jinstabu *in vivo*.

11. Irritazzjoni tal-ġilda pprovokata minn sustanzi kimiċi, murija permezz ta' eritema u edema, hija r-riżultat ta' katina ta' avvenimenti li bdew mill-penetrazzjoni tal-i*stratum corneum* u l-ħsara lis-saffi ta' taħt il-keratinoċiti. Il-keratinoċiti li jkunu qed imutu jirrilaxxaw medjaturi li jibdew il-katina infjammatorja li jaġixxu fuq iċ-ċelloli fid-*dermis*, b'mod partikolari ċ-ċelloli stromali u endoteljali. Hija d-dilatazzjoni u l-permeabilità akbar taċ-ċelloli endoteljali li jipproduċu l-eritema u l-edema osservati (24). Il-metodi bbażati fuq l-RhE jkejlu l-avvenimenti tal-bidu tal-katina.

12. Il-vijabbiltà taċ-ċelloli fil-mudelli tal-RhE titkejjel minn konverżjoni enzimatika tal-kulur vitali MTT [3-(4,5-Dimetiltijażol-2-il)-2,5-bromur tad-difeniltetrażolju, Thiażoljl blu; numru tal-CAS 298-93-1 f'melħ formażan blu li huwa mkejjel b'mod kwantitattiv wara l-estrazzjoni mit-tessuti (25). Sustanzi kimiċi huma identifikati mill-abbiltà tagħhom li jnaqqsu l-vijabbiltà taċ-ċellola taħt il-livelli massimi definiti (jiġifieri $\leq$ 50 %, għall-GHS tan-NU/ Kategorija 2 tas-CLP tal-UE). Skont il-qafas regolatorju li fih jintużaw ir-riżultati ta' dan it-TM, is-sustanzi kimiċi li jipproduċu vijabbiltajiet taċ-ċellola ogħla mil-livell massimu definit, jistgħu jitqiesu bħala mhux irritanti (jiġifieri > 50 %, L-Ebda Kategorija).

WIRI TAL-PROFIĊJENZA

13. Qabel l-użu ta' rutina ta' kwalunkwe mit-tliet metodi validati li jaderixxu ma' dan it-TM, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika, billi jużaw l-għaxar Sustanzi Kimiċi ta' Referenza elenkati fit-Tabella 1. Għal metodi simili żviluppati skont dan it-TM jew għal modifiki ta' kwalunkwe mit-tliet metodi validati, għandhom jiġu ssodisfati r-rekwiżiti tal-PS spjegati fl-Appendiċi 2 ta' dan it-TM qabel ma jintuża l-metodu għall-ittestjar regolatorju.

14. Bħala parti mill-eżerċizzju tal-profiċjenza, huwa rrakkomandat li l-utent jivverifika l-karatteristiċi ta' protezzjoni tat-tessuti wara li dawn jiġu riċevuti kif speċifikat mill-produttur tal-mudell tal-RhE. Dan huwa ta' importanza partikolari jekk it-tessuti jintbagħtu minn distanzi twal jew jekk idumu biex jaslu. Ladarba metodu jkun ġie stabbilit b'suċċess u tkun intweriet profiċjenza fl-użu tiegħu, verifika bħal din ma għandhiex tkun meħtieġa fuq bażi ta' rutina. Madankollu, meta jintuża metodu b'rutina, huwa rrakkomandat li jibqgħu jiġu vvalutati l-karatteristiċi ta' protezzjoni f'intervalli regolari.

Tabella 1: Sustanzi Kimiċi ta' Referenza[1]

Sustanza Kimika	Nru tal-CAS	Riżultat *in vivo*[2]	Stat fiżiku	GHS tan-NU/Kategorija tas-CLP tal-UE
aċidu naftilaċetiku	86-87-3	0	Solidu	L-ebda Kat.
isopropanol	67-63-0	0.3	Likwidu	L-ebda Kat.
stearate tal-metil	112-61-8	1	Solidu	L-ebda Kat.
butirat tal-ettil	5870-93-9	1.7	Likwidu	L-ebda Kat. (*Kat. 3 fakultattiva*)[3,4]
saliċilat tal-eżil	6259-76-3	2	Likwidu	L-ebda Kat. (*Kat. 3 fakultattiva*)[3,4]
ċiklamen tal-aldeid	103-95-7	2.3	Likwidu	Kat. 2
1-bromoeżan	111-25-1	2.7	Likwidu	Kat. 2
idrossidu tal-potassju (5% soluzzjoni milwiema)	1310-58-3	3	Likwidu	Kat. 2
1-metil-3-fenil-1-piperażina	5271-27-2	3.3	Solidu	Kat. 2
Ettanal	111-71-7	3.4	Likwidu	Kat. 2

[1] Dawn is-Sustanzi Kimiċi ta' Referenza huma sottosett tas-Sustanzi Kimiċi ta' Referenza użati fl-istudju ta' validazzjoni.

[2] Ir-riżultat *in vivo* skont il-B.4 u l-Linja Gwida 404 tat-Test tal-OECD (4).

[3] Taħt dan il-Metodu ta' Ttestjar, il-Kategorija 3 (irritanti minuri) fakultattiva tal-GHS tan-NU (1) hija meqjusa bħala L-Ebda Kategorija.

[4] Il-Kategorija 3 fakultattiva tal-GHS tan-NU mhijiex applikabbli skont is-CLP tal-UE.

PROĊEDURA

15. Din li ġejja hija deskrizzjoni tal-komponenti u l-proċeduri ta' metodu tal-RhE għal eżami ta' irritazzjoni tal-ġilda. Mudell tal-RhE għandu jiġi rikostruwit, u jista' jitħejja mill-persunal impjegat jew inkella miksub b'mod kummerċjali. Hemm disponibbli proċeduri Standard ta' Operat (SOPs - Standard Operating Procedures) għal EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200) u SkinEthic™ RHE (26)(27)(28). L-ittestjar għandu jitwettaq skont dawn li ġejjin:

Komponenti tal-METODU TA' TTESTJAR tal-RhE

Kundizzjonijiet ġenerali

16. Keratinoċiti umani mhux trasformati għandhom jintużaw sabiex jerġgħu jibnu l-epitelju. Is-saffi multipli ta' ċelloli epitelji vijabbli (saff tal-qiegħ, *stratum spinosum, stratum granulosum*) għandhom ikunu preżenti taħt *stratum corneum* funzjonali. L-*istratum corneum* għandu jkollu saffi multipli li jkun fihom il-profil lipidu essenzjali sabiex jipproduċu protezzjoni funzjonali robusta sabiex tirreżisti l-penetrazzjoni rapida ta' sustanzi kimiċi markaturi ċitotossiċi, pereżempju dodeċilsulfat tas-sodju (SDS - Sodium Dodecyl Sulphate)

jew Triton X-100. Il-funzjoni ta' protezzjoni għandha tintwera u tista' tiġi eżaminata jew permezz ta' determinazzjoni tal-konċentrazzjoni li fiha s-sustanza kimika markatriċi tnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % (IC_{50}) wara ħin ta' esponiment fiss, jew permezz ta' determinazzjoni tal-ħin ta' esponiment meħtieġ sabiex il-vijabbiltà taċ-ċellola titnaqqas b'50% (ET_{50}) wara l-applikazzjoni tas-sustanza kimika markatriċi b'konċentrazzjoni speċifika u fissa. Il-karatteristiċi ta' trażżin tal-mudell tal-RhE għandhom iwaqqfu l-passaġġ ta' materjal madwar l-i*stratum corneum* għat-tessut vijabbli, li nkella jwassal għal immudellar ta' livell baxx tal-esponiment tal-ġilda. Il-mudell tal-RhE għandu jkun ħieles minn kontaminazzjoni minn batterji, vajrusijiet, majkoplasma, jew fungi.

Kundizzjonijiet funzjonali

Vijabbiltà

17. L-analiżi użata għad-determinazzjoni tad-daqs tal-vijabbiltà hija l-analiżi tal-MTT (25). L-utenti tal-mudell tal-RhE għandhom jiżguraw li kull lott mill-mudell tal-RhE użat jissodisfa l-kriterji definiti għall-kontroll negattiv (NC - Negative Control). Id-densità ottika (OD - Optical Density) tas-solvent ta' estrazzjoni waħedha għandha tkun żgħira biżżejjed, jiġifieri OD <0.1. Firxa ta' aċċettabilità (l-ogħla limitu jew il-limitu inferjuri) għall-valuri tal-OD ta' kontroll negattiv (fil-kundizzjonijiet tal-Metodu ta' Ttestjar ta' Irritazzjoni tal-Ġilda) hija stabbilita mill-iżviluppatur/fornitur tal-mudell tal-RhE, u l-firxiet ta' aċċettabilità għat-tliet metodi validati huma pprovduti fit-Tabella 2. Għandu jiġi dokumentat li t-tessuti ttrattati bl-NC huma stabbli fil-kultura (jipprovdu kejl tal-vijabbiltà simili) sakemm idum il-perjodu tat-test ta' esponiment.

<u>Tabella 2:</u> Firxiet ta' aċċettabilità għall-valuri negattivi tal-OD ta' kontroll

	Limitu inferjuri ta' aċċettabilità	**L-ogħla limitu ta' aċċettabilità**
EpiSkin™ (SM)	≥ 0.6	≤ 1.5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1.0	≤ 2.5
SkinEthic™ RHE	≥ 1.2	≤ 2.5

Funzjoni ta' protezzjoni

18. L-i*stratum corneum* u l-kompożizzjoni lipida tiegħu għandhom ikunu biżżejjed sabiex jirreżistu l-penetrazzjoni rapida tas-sustanzi kimiċi markaturi ċitotossiċi, eżempju SDS jew Triton X-100, kif stmat minn IC_{50} jew ET_{50} (Tabella 3).

Morfoloġija

19. Għandu jitwettaq eżami istoloġiku tal-mudell tal-RhE li juri struttura li tixbah lill-*epidermide* umana (inkluż l-i*stratum corneum* b'saffi multipli).

Riproduċibbiltà

20. Ir-riżultati tas-sustanza kimika ta' kontroll pożittiv (PC – Positive Control) u l-kontrolli negattivi (NC) tal-metodu ta' ttestjar għandhom juru riproduċibbiltà maż-żmien.

Kontroll tal-kwalità (QC – Quality Control)

21. L-iżviluppatur/il-fornitur tal-mudell tal-RhE għandu jiżgura u juri li kull lott mill-mudell tal-RhE użat jissodisfa l-kriterji tat-tnedija tal-produzzjoni definiti, fosthom dawk għall-*vijabbiltà* (paragrafu 17), il-*funzjoni ta' protezzjoni* (paragrafu 18) u l-*morfoloġija* (paragrafu 19) huma l-aktar rilevanti. Din id-dejta għandha tiġi pprovduta lill-utenti tal-metodu, sabiex ikunu jistgħu jinkludu din l-informazzjoni fir-rapport tat-test. Firxa ta' aċċettabilità (l-ogħla limitu jew il-limitu inferjuri) għall-IC_{50} jew għall-ET_{50} għandhom jiġu stabbiliti mill-iżviluppatur/fornitur tal-mudell tal-RhE (jew l-investigatur meta jintuża l-mudell imfassal mill-persunal imħaddem). Dawk ir-riżultati li huma prodotti b'tessuti kkwalifikati biss jistgħu jiġu aċċettati għal tbassir affidabbli ta' klassifikazzjoni ta' irritazzjoni. Bħal pereżempju, il-firxiet ta' aċċettabilità għat-tliet metodi validati huma pprovduti fit-Tabella 3.

Tabella 3: Eżempji ta' kriterji tal-QC ta' rilaxx tal-lott

	Limitu inferjuri ta' aċċettabilità	**L-ogħla limitu ta' aċċettabilità**
EpiSkin™ (SM) (trattament ta' 18-il siegħa b' SDS)(26)	IC_{50} = 1.0 mg/ml	IC_{50} = 3.0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1% Triton X-100)(27)	ET_{50} = 4.8 hr	ET_{50} = 8.7 hr
SkinEthic™ RHE (1% Triton X-100)(28)	ET_{50} = 4.0 hr	ET_{50} = 9.0 hr

Applikazzjoni tas-Sustanzi Kimiċi tat-Test u ta' Kontroll

22. Tal-inqas għandhom jintużaw tliet repliki għal kull sustanza kimika tat-test u għall-kontrolli f'kull sessjoni. Għal-likwidi kif ukoll għas-solidi, għandu jiġi applikat ammont suffiċjenti ta' sustanza kimika tat-test sabiex ikopri b'mod uniformi l-wiċċ tal-*epidermide* filwaqt li tiġi evitata doża infinita, jiġifieri għandu jintuża minimu ta' 25 µL/cm^2 jew 25 mg/cm^2. Għal solidi, il-wiċċ tal-*epidermide* għandu jixxarrab b'ilma dejonizzat jew distillat qabel l-applikazzjoni, sabiex jitjieb il-kuntatt bejn is-sustanza kimika tat-test u l-wiċċ tal-*epidermide*. Kull meta dan ikun possibbli, is-solidi għandhom jiġu ttestjati bħala trab fin. Fi tmiem il-perjodu ta' esponiment, is-sustanza kimika tat-test għandha tinħasel bir-reqqa mill-wiċċ tal-*epidermide* b'bafer milwiem, jew b'0.9 % NaCl. Skont liema wieħed mit-tliet metodi tal-RhE validati jintuża, il-perjodu ta' esponiment ivarja bejn 15-il minuta u 60 minuta, u t-temperatura ta' inkubazzjoni bejn 20 u 37°C. Dawn il-perjodi u t-temperaturi ta' esponiment huma ottimizzati għal kull metodu tal-RhE u jirrappreżentaw karatteristiċi intrinsiċi differenti tal-metodi, iżda għad-dettalji ara l-Proċeduri Standard ta' Operazzjoni (SOPs) għall-metodi (26)(27)(28).

23. F'kull sessjoni għandhom jintużaw NC u PC simultanji sabiex juru li l-vijabbiltà (mal-NC), il-funzjoni ta' protezzjoni u s-sensittività tat-tessut li tirriżulta (mal-PC) tat-tessuti huma fi ħdan firxa ta' aċċettabilità storika definita. Il-PC issuġġerit huwa ta' SDS 5 %

milwiemi. Is-sustanzi kimiċi tal-NC huma ilma jew ilma bil-melħ ibbaferjat bil-fosfat (PBS - Phosphate Buffered Saline).

Kejl tal-Vijabbiltà taċ-Ċelloli

24. L-aktar element importanti tal-proċedura tat-test huwa li l-kejl tal-vijabbiltà ma jsirx immedjatament wara l-esponiment għas-sustanzi kimiċi tat-test, iżda wara perjodu, ta' inkubazzjoni ta' wara t-trattament tat-tessuti mlaħalħa f'mezz ġdid, twil biżżejjed. Dan il-perjodu jippermetti kemm l-irkupru minn effetti ċitotossiċi dgħajfa kif ukoll il-manifestazzjoni tal-effetti ċitotossiċi b'mod ċar. Il-fażi ta' ottimizzazzjoni tat-test (11) (12) (13) (14) (15) uriet li perjodu ta' inkubazzjoni ta' 42 siegħa wara t-trattament kien wieħed ottimali.

25. L-analiżi MTT hija metodu kwantitattiv validat li għandu jintuża sabiex ikejjel il-vijabbiltà taċ-ċellola taħt dan it-TM. Hija kompatibbli mal-użu f'bini ta' tessut tridimensjonali. Il-kampjun tat-tessut jitqiegħed f'soluzzjoni MTT b'konċentrazzjoni xierqa (eżempju 0.3 - 1 mg/mL) għal 3 sigħat. Imbagħad, il-prodott fromażan blu preċipitat jiġi estratt mit-tessut billi jintuża solvent (eżempju isopropanol, isopropanol aċiduż), u l-konċentrazzjoni tal-formażan titkejjel billi tiġi determinata l-OD ta' 570 nm billi jintuża filtru ta' faxx ta' frekwenza ta' massimu ta' ± 30 nm.

26. Il-karatteristiċi ottiċi tas-sustanza kimika ta' ttestjar jew l-azzjoni kimika tagħha fuq l-MTT jistgħu jinterferixxu mal-analiżi u dan iwassal għal stima falza tal-vijabbiltà (għax is-sustanza kimika tat-test tista' tipprevjeni jew treġġa' lura l-ġenerazzjoni tal-kulur kif ukoll tikkawżaha). Dan jista' jseħħ meta sustanza kimika tat-test speċifika ma titneħħiex kompletament mit-tessut bi tlaħliħ jew meta din tippenetra l-*epidermide*. Jekk sustanza kimika tat-test taġixxi direttament fuq l-MTT (tnaqqas l-MTT), ikollha kulur naturali, jew issir ikkulurita matul it-trattament tat-tessut, għandhom jintużaw kontrolli addizzjonali sabiex jiġu identifikati u kkoreġuti l-interferenzi tas-sustanzi kimiċi tat-test mat-teknika ta' kejl tal-vijabbiltà. Spjegazzjoni dettaljata dwar kif għandhom jiġu kkoreġuti tnaqqis u interferenzi diretti tal-MTT permezz ta' aġenti li jagħtu l-kulur hija disponibbli fl-SOPs għat-tliet metodi validati (26)(27)(28).

Kriterji ta' aċċettabilità

27. Għal kull metodu li juża lottijiet tal-mudell tal-RhE validi (ara l-paragrafu 21), it-tessuti ttrattati bl-NC għandhom jimmanifestaw OD li tirrefletti l-kwalità tat-tessuti li segwew il-passi ta' kunsinna u riċevuta u l-proċessi kollha tal-protokoll. Valuri ta' kontroll tal-OD ma għandhomx ikunu aktar baxxi mil-limiti storikament stabbiliti. B'mod simili, it-tessuti ttrattati bil-PC, jiġifieri SDS 5 % milwiema, għandhom jirreflettu l-abbiltà tagħhom li jirreaġixxu għal sustanza kimika irritanti taħt il-kundizzjonijiet tat-TM (26) (27) (28). Għandhom jiġu ddefiniti l-miżuri assoċjati u adattati ta' varjabbiltà bejn ir-repliki tat-tessuti (eżempju jekk jintużaw devjazzjonijiet standard (SD - Standard Deviations) dawn għandhom ikunu fi ħdan l-intervall ta' tolleranza unilaterali ta' 95 % ikkalkolat mid-dejta storika; għall-SD tal-VRM < 18 %).

Interpretazzjoni tal-Mudell tar-Riżultati u Tbassir

28. Il-valuri tal-OD miksuba minn kull sustanza kimika tat-test jistgħu jintużaw sabiex jiġi kkalkolat il-perċentwal ta' vijabbiltà normalizzat għall-NC, li huwa stabbilit għal 100 %. Il-valur ta' limitu ta' perċentwal tal-vijabbiltà ta' ċellola li jiddistingwi sustanzi kimiċi tat-test irritanti minn dawk mhux klassifikati u l-proċedura/i statistika/statistiċi użata/i sabiex jiġu

evalwati r-riżultati u jiġu identifikati s-sustanzi kimiċi irritanti għandhom jiġu ddefiniti u dokumentati b'mod ċar u għandu jintwera li dawn huma xierqa. Il-valuri ta' limitu għat-tbassir tal-irritazzjoni huma pprovduti hawn taħt:

> Is-sustanza kimika tat-test hija kkunsidrata bħala <u>irritanti</u> għall-ġilda skont il-GHS tan-NU/il-Kategorija 2 tas-CLP tal-UE jekk il-vijabbiltà tat-tessut wara l-esponiment u l-inkubazzjoni ta' wara t-trattament tkun inqas minn jew daqs (≤) 50 %.
>
> Skont il-qafas regolatorju li fih jintużaw ir-riżultati ta' dan it-TM, is-sustanza kimika tat-test tista' titqies bħala <u>mhux irritanti</u> għall-ġilda skont L-Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/is-CLP tal-UE jekk il-vijabbiltà tat-tessut wara l-esponiment u l-inkubazzjoni ta' wara t-trattament tkun aktar minn (>) 50 %.

DEJTA U RAPPORTAR

Dejta

29. Għal kull sessjoni, dejta minn tessuti replikati individwali (pereżempju valuri tal-OD u dejta dwar il-perċentwal ikkalkolat ta' vijabbiltà taċ-ċellola għal kull sustanza kimika tat-test, inkluża l-klassifikazzjoni) għandha tiġi rrapportata f'forma tabulari, inkluża d-dejta minn esperimenti ripetuti, kif ikun xieraq. Barra minn hekk, għandhom jiġu rrapportati l-SD ± medji għal kull sessjoni. Interazzjonijiet osservati mar-reaġent u s-sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti tal-MTT għandhom jiġu rrapportati għal kull sustanza kimika ttestjata.

Rapport tat-test

30. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanzi Kimiċi tat-Test u ta' Kontroll:

- -L-isem/l-ismijiet tas-sustanzi kimiċi bħall-isem u n-numru tal-CAS, l-isem u n-numru tal-KE, jekk dawn ikunu magħrufa;
- -Il-purità u l-kompożizzjoni tas-sustanza kimika (f'perċentwal(i) skont il-piż);
- -Karatteristiċi fiżiċi/kimiċi rilevanti għat-twettiq tal-istudju (pereżempju l-istat fiżiku, l-istabbiltà, il-volatilità, il-pH u s-solubilità fl-ilma jekk dawn ikunu magħrufa);
- -Trattament tas-sustanzi kimiċi tat-test/ta' kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, tħin);
- -Kundizzjonijiet ta' ħżin;

Ġustifikazzjoni tal-mudell tal-RhE u tal-protokoll użati

Kundizzjonijiet tat-Test:

- -Sistema ta' ċelloli użati;
- -Informazzjoni ta' appoġġ kompluta għall-mudell tal-RhE speċifiku użat inkluża l-prestazzjoni tiegħu. Din l-informazzjoni għandha tiġi inkluża, iżda ma għandhiex tkun limitata għal dawn;
  - i) vijabbiltà

ii) funzjoni ta' protezzjoni

iii) morfoloġija

iv) riproduċibbiltà u prevedibbiltà

v) Kontrolli tal-kwalità (QC) tal-mudell

-Dettalji tal-proċedura tat-test użata;

-Dożi tat-test użati, dewmien tal-esponiment u l-perjodu ta' inkubazzjoni wara t-trattament;

-Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test;

-Referenza għad-dejta storika tal-mudell. Din għandha tinkludi, iżda ma għandhiex tkun limitata għal:

i) aċċettabilità tad-dejta tal-QC b'referenza għad-dejta storika tal-lottijiet

ii) aċċettabilità tal-valuri ta' kontroll pożittivi u negattivi b'referenza għall-mezzi u l-meded ta' kontroll pożittivi u negattivi

-Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni użati, inkluża l-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-punt (i) ta' limitu għall-mudell ta' tbassir;

- Referenza għad-dejta storika ta' kontroll;

Riżultati:

-Tqassim tad-dejta f'forma tabulari minn sustanzi kimiċi tat-test individwali għal kull sessjoni u għal kull kejl ta' replika;

-Indikazzjoni tal-kontrolli użati għal sustanzi kimiċi diretti li jnaqqsu l-MTT u/jew sustanzi kimiċi tat-test li jerħu l-kulur;

-Deskrizzjoni ta' effetti oħra osservati;

Diskussjoni dwar ir-riżultati

Konklużjoni

LETTERATURA

(1)UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Tielet edizzjoni riveduta, UN New York and Geneva. Disponibbli fuq: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]

(2)EC-ECVAM (2009), Statement on the "Performance under UN GHS of three *in vitro* assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards", maħruġ mill-Kumitat Xjentifiku Konsultattiv tal-ECVAM (ESAC30), 9 ta' April 2009. Disponibbli fuq: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(3) Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006. ĠU L 353, 31.12.2008, p. 1.

(4)OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals Nru 404, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(5)OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER), OECD Guideline for the Testing of Chemicals Nru 430, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(6)OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals Nru 431, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq: [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 Nru 435, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(8)KE-ECVAM (2009), Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE)? Disponibbli fuq: [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 Nru 34, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq: [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. u 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. u 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. u 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. u 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. u Rubinsteen, G. (2005), The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, ATLA 33, 329-349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. u 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. u 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. Disponibbli fuq: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. u 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. u 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. Disponibbli fuq: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Disponibbli fuq: [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 ta’ Novembru 2008. Disponibbli fuq: [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, Nru 137, OECD, Parigi. Disponibbli fuq:
[http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html]

(24) Welss, T., Basketter, D.A. u Schröder, K.R. (2004), *In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models, Toxicol. in Vitro 18, 231-243.

(25) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65, 55-63.

(26) EpiSkin™ SOP, Verżjoni 1.8 (Frar 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min - 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Disponibbli fuq: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(27) EpiDerm™ SOP, Verżjoni 7.0 (Riveduta Marzu 2009), Protokoll għal: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Disponibbli fuq: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(28) SkinEthic™ RHE SOP, Verżjoni 2.0 (Frar 2009), SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Disponibbli fuq: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(29) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., u Maibach, H.I. (1995), Irritant contact dermatitis, In: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(30) Id-Direttiva tal-kummissjoni 2001/59/KE tas-6 ta' Awissu 2001 li taddatta għall-progres tekniku għat-28 darba d-Direttiva tal-Kunsill 67/548/KEE rigward l-approssimazzjoni tal-liġijiet, tar-regolamenti u tad-dispożizzjonijiet amministrattivi dwar il-klassifikazzjoni, l-imballaġġ u l-ittikkettjar ta' sustanzi perikolużi, ĠU L 225, 21.8.2001, p.1.

(31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. u 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. u 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. u 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.

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Preċiżjoni: Il-viċinanza tal-qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri ta' referenza aċċettati. Hija miżura ta' prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u aspett wieħed ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (14).

Sustanza ta' riferiment: Sustanza sensitizzanti jew mhux sensitizzanti użata bħala standard għat-tqabbil ma' sustanza tat-test. Is-sustanza ta' riferiment għandu jkollha l-karatteristiċi li ġejjin; (i) sors(i) konsistenti u affidabbli; (ii) similarità strutturali u funzjonali għall-klassi ta' sustanzi li jkunu qed jiġu ttestjati; (iii) karatteristiċi fiżikokimiċi magħrufa; (iv) dejta ta' appoġġ dwar effetti magħrufa, u (v) potenza magħrufa fil-firxa ta' rispons mixtieq.

Limitu stmat ta' konċentrazzjoni (ECt): Konċentrazzjoni stmata ta' sustanza tat-test meħtieġa sabiex jiġi prodott indiċi ta' stimolazzjoni li huwa indikattiv ta' rispons pożittiv.

Konċentrazzjoni stmata ta' tlieta (EC3): Konċentrazzjoni stmata ta' sustanza tat-test meħtieġa sabiex jiġi prodott indiċi ta' stimolazzjoni ta' tlieta.

Negattiv falz: Sustanza tat-test identifikata ħażin bħala negattiv jew mhux attiva b'metodu ta' ttestjar, meta fil-fatt hija pożittiva jew attiva.

Pożittiv falz: Sustanza tat-test identifikata ħażin bħala pożittiva jew attiva minn test, meta fil-fatt hija negattiva jew mhux attiva.

Periklu: Il-potenzjal għal effett avvers għas-saħħa jew għall-ambjent. L-effett avvers jidher biss jekk hemm esponiment ta' livell suffiċjenti.

Riproduċibbiltà interlaboratorja: Kejl sa fejn il-laboratorji kwalifikati differenti, li jużaw l-istess protokoll u li jittestjaw l-istess sustanzi tat-test, jistgħu jipproduċu riżultati li huma simili b'mod kwalitattiv u kwantitattiv. Ir-riproduċibbiltà interlaboratorja hija determinata matul il-proċessi ta' validazzjoni u ta' validazzjoni minn qabel, u tindika sa fejn test jista' jiġi trasferit b'suċċess bejn laboratorji, u tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà bejn laboratorji (14).

Riproduċibbiltà intralaboratorja: Determinazzjoni ta' kemm il-persuni kwalifikati fi ħdan l-istess laboratorju jista' jirnexxilhom jirreplikaw ir-riżultati billi jużaw protokoll speċifiku fi żminijiet differenti. Din tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà fi ħdan il-laboratorju (14).

Test "me-too": Espressjoni li tingħad fit-taħdit komuni għal metodu ta' ttestjar li huwa strutturalment u funzjonalment simili għal metodu ta' ttestjar ta' referenza validat u aċċettat. Metodu ta' ttestjar bħal dan ikun kandidat għal validazzjoni rapida ("catch-up validation"). Jintuża b'mod alternanti ma' metodu ta' ttestjar simili (14).

Outlier: Outlier hija osservazzjoni li hija mmarkata differenti minn valuri oħra f'kampjun aleatorju minn popolazzjoni.

Standards ta' Prestazzjoni (PS): Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validu, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' metodu ta' ttestjar propost li huwa simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Hemm inklużi; (i) komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar; (ii) lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati sabiex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (iii) il-

livelli simili ta' preċiżjoni u affidabbiltà, ibbażati fuq x'inkiseb għall-metodu ta' ttestjar validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta jiġi evalwat billi tintuża l-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza (14).

Metodu ta' ttestjar ta' speċjalità: Metodu ta' ttestjar li l-manifattura u d-distribuzzjoni tiegħu huma ristretti minn privattivi, drittijiet tal-awtur, marki kummerċjali, eċċ.

Garanzija tal-kwalità: Proċess ta' ġestjoni li skontu l-aderenza mal-istandards ta' ttestjar tal-laboratorji, ir-rekwiżiti u l-proċeduri ta' żamma tar-rekords u l-preċiżjoni tat-trasferiment tad-dejta jiġu vvalutati minn individwi li huma indipendenti minn dawk li jwettqu l-ittestjar.

Sustanzi kimiċi ta' referenza: Sustanzi kimiċi magħżula għall-użu fil-proċess ta' validazzjoni, li għalihom huma diġà magħrufa r-reazzjonijiet fis-sistema ta' ttestjar ta' referenza *in vitro* jew *in vivo* jew l-ispeċi ta' interess. Dawn is-sustanzi kimiċi għandhom ikunu rappreżentanti tal-klassijiet ta' sustanzi kimiċi li għalihom huwa mistenni jintuża l-metodu ta' ttestjar, u dawn għandhom jirrappreżentaw il-firxa sħiħa ta' reazzjonijiet li jistgħu jkunu mistennija mis-sustanzi kimiċi li għalihom huwa mistenni li jintuża dan il-metodu ta' ttestjar, minn qawwija, għal dgħajfa, sa negattivi. Settijiet differenti ta' sustanzi kimiċi ta' referenza jistgħu jkunu meħtieġa għall-istadji differenti tal-proċess ta' validazzjoni, u għal metodi ta' ttestjar u użi tat-testijiet differenti (14).

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test għall-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-konsiderazzjoni tal-preċiżjon (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (14).

Affidabbiltà: Kejl li jiddetermina kemm il-metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fi ħdan u bejn il-laboratorji maż-żmien, meta dan jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din hija eżaminata billi tiġi kkalkolata r-riproduċibbiltà intralaboratorja u dik interlaboratorja (14).

Sensitizzazzjoni tal-ġilda: Proċess immunoloġiku li jitfaċċa meta individwu suxxettibbli jkun espost b'mod topiku għal allerġen kimiku induttur, li jipprovoka rispons immuni fil-ġilda li jista' jwassal għall-iżvilupp ta' sensitizzazzjoni mal-kuntatt.

Indiċi ta' Stimolazzjoni (SI): Valur ikkalkolat sabiex jeżamina l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' sustanza tat-test li huwa l-proporzjon tal-proliferazzjoni fil-gruppi ttrattati għal dik fil-grupp ta' kontroll ta' mezz simultanju.

Sustanza tat-test (li hija msemmija wkoll sustanza kimika tat-test): Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan it-TM.

Metodu ta' ttestjar validat: Metodu ta' ttestjar li għalih tlestew studji ta' validazzjoni sabiex jiġu ddeterminati r-rilevanza (inkluża l-preċiżjoni) u l-affidabbiltà għal skop speċifiku. Huwa importanti li jiġi osservat li metodu ta' ttestjar validat jista' ma jkollux prestazzjoni suffiċjenti f'termini ta' preċiżjoni u affidabbiltà sabiex jitqies aċċettabbli għall-iskop propost (14)."

Appendiċi 2

STANDARDS TA' PRESTAZZJONI GĦALL-VALUTAZZJONI TA' METODI TA' *EPIDERMIS* UMANA RIKOSTRUWITA (RhE) *IN VITRO* SIMILI JEW IMMODIFIKATI PROPOSTI GĦALL-IRRITAZZJONI TAL-ĠILDA

INTRODUZZJONI

1. L-għan tal-Istandards tal-Prestazzjoni (PS) huwa li tiġi kkomunikata l-bażi li permezz tagħha metodi ġodda, kemm proprjetarji (jiġifieri, bi drittijiet tal-awtur, b'marka kummerċjali, irreġistrati) kif ukoll mhux proprjetarji jistgħu jitqiesu li għandhom preċiżjoni u affidabbiltà suffiċjenti għal skopijiet speċifiċi ta' ttestjar. Dawn il-PS, ibbażati fuq metodi vvalidati u aċċettati, jistgħu jintużaw għall-evalwazzjoni tal-affidabbiltà u l-preċiżjoni ta' metodi analogi oħrajn (magħrufin bħala testijiet "me-too") li huma bbażati fuq prinċipji xjentifiċi simili u jkejlu jew ibassru l-istess effett bijoloġiku jew tossiku (9).

2. Qabel l-adozzjoni ta' metodi mmodifikati, jiġifieri titjib potenzjali propost ta' metodu approvat, għandu jkun hemm evalwazzjoni sabiex ikun stabbilit l-effett tal-bidliet proposti fuq ir-rendiment tat-test u sa liema punt dawn il-bidliet jaffettwaw l-informazzjoni disponibbli għall-komponenti l-oħrajn tal-proċess ta' validazzjoni. Skont l-għadd u t-tip ta' bidliet proposti, id-dejta ġġenerata u d-dokumentazzjoni ta' appoġġ għal dawk il-bidliet, dawn jew għandhom ikunu soġġetti għall-istess proċess ta' validazzjoni kif deskritt għal test ġdid, kif ukoll, jekk xieraq, għal evalwazzjoni limitata tal-affidabbiltà u r-rilevanza permezz ta' PS stabbiliti (9).

3. Metodi simili (me-too) jew immodifikati ta' kwalunkwe wieħed mit-tliet metodi vvalidati [EpiSkin™ (Metodu ta' Referenza Vvalidat (Validated Reference Method – VRM)), EpiDerm™ SIT (EPI-200) u SkinEthic™ RHE] proposti għall-użu taħt dan it-TM għandhom jiġu evalwati sabiex jiġu stabbiliti l-affidabbiltà u l-preċiżjoni tagħhom permezz ta' sustanzi kimiċi li jirrappreżentaw il-firxa sħiħa tal-punteġġi ta' irritazzjoni Draize. Meta jiġu evalwati permezz tal-20 Sustanza kimika ta' Referenza rrakkomandati tal-PS (Tabella 1), il-metodi simili jew immodifikati proposti għandu jkollhom valuri ta' affidabbiltà u preċiżjoni li jkunu komparabbli jew aqwa minn dawk li ħarġu mill-VRM (Tabella 2) (2) (16). Il-valuri ta' affidabbiltà u preċiżjoni li għandhom jinkisbu huma pprovduti fil-paragrafi 8 sa 12 ta' dan l-Appendiċi. Sustanzi kimiċi mhux ikklassifikati (Ebda Kategorija tal-UN GHS/EU CLP) u kklassifikati (Kategorija 2 tal-UN GHS/EU CLP) (1), li jirrappreżentaw klassijiet differenti ta' sustanzi kimiċi huma inklużi, sabiex l-affidabbiltà u l-preċiżjoni (is-sensittività, l-ispeċifiċità u l-preċiżjoni ġenerali) tal-metodu propost jistgħu jitqabblu ma' dawk tal-VRM. L-affidabbiltà tal-metodu, kif ukoll il-kapaċità tiegħu li jidentifika tajjeb sustanzi kimiċi irritanti fil-Kategorija 2 tal-UN GHS/EU CLP u, skont il-qafas regolatorju li għalih tiġi prodotta d-dejta, il-kapaċità tiegħu wkoll li jidentifika tajjeb sustanzi kimiċi ta' Ebda Kategorija tal-UN GHS/EU CLP (għandha tiġi stabbilita qabel l-użu tiegħu għall-ittestjar ta' sustanzi kimiċi tat-test ġodda.

4. Dawn il-PS huma bbażati fuq il-PS tal-EC-ECVAM (8), aġġornati skont is-sistemi dwar il-klassifikazzjoni u t-tikkettar tal-UN GHS u tal-EU CLP (1) (3). Il-PS oriġinali kienu definiti wara li tlesta l-istudju ta' validazzjoni (21) u kienu bbażati fuq is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-UE kif stipulata fid-Direttiva tal-Kummissjoni 2001/59/KE tas-6 ta' Awwissu 2001 li tadatta għall-progress tekniku għat-28 darba d-Direttiva tal-Kunsill Nru 67/548/KEE dwar l-approssimazzjoni tal-liġijiet, ir-regolamenti u d-dispożizzjonijiet

amministrattivi rigward il-klassifikazzjoni, l-imballaġġ u l-ittikkettjar tas-sustanzi perikolużi[1]. Minħabba l-adozzjoni tas-sistema UN GHS għall-klassifikazzjoni u t-tikkettar fl-UE (EU CLP) (3), li seħħet bejn il-finalizzazzjoni tal-istudju ta' validazzjoni u t-tlestija ta' dan it-TM, il-PS ġew aġġornati (8). Dan l-aġġornament jirrigwarda l-aktar il-bidliet (i), fis-sett ta' PS għas-Sustanzi Kimiċi ta' Referenza; u (ii), il-valuri definiti ta' affidabbiltà u preċiżjoni (2) (23).

[1] ĠU L 225, 21.8.2001, p. 1.

STANDARDS TA' PRESTAZZJONI GĦAL METODI TA' TTESTJAR *IN VITRO* TAL-RhE GĦALL-IRRITAZZJONI TAL-ĠILDA

5. Il-PS jinkludi dawn it-tliet elementi (9):

I) Komponenti Essenzjali tal-Metodu ta' Ttestjar

II) Lista Minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza

III) Valuri Definiti ta' Affidabbiltà u Preċiżjoni

<u>I) Komponenti Essenzjali tal-Metodu ta' Ttestjar</u>

6. Dawn jikkonsistu f'elementi essenzjali strutturali, funzjonali u proċedurali ta' metodu vvalidat li għandhom ikunu inklużi fil-protokoll ta' metodu mekkanikament u funzjonalment simili jew immodifikat propost. Dawn il-komponenti jinkludu karatteristiċi uniċi tal-metodu, dettalji proċedurali kritiċi, u miżuri ta' kontroll tal-kwalità. Il-konformità mal-komponenti essenzjali tal-metodu ta' ttestjar tgħin sabiex tiżgura li metodu propost ieħor simili jew immodifikat ikun ibbażat fuq l-istess kunċetti bħall-VRM korrispondenti (9). Il-komponenti essenzjali tal-metodu ta' ttestjar huma deskritti fid-dettall fil-paragrafi 16 sa 21 tat-TM u l-ittestjar għandu jsir skont dan li ġej:

Il-kundizzjonijiet ġenerali (paragrafu 16)

Il-kundizzjonijiet funzjonali, li jinkludu:

- vijabbiltà (paragrafu 17);
- funzjoni ta' barriera (paragrafu 18);
- morfoloġija (paragrafu 19);
- riproduċibbiltà (paragrafu 20); u,
- kontroll tal-kwalità (paragrafu 21)

<u>II) Lista Minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza</u>

7. Is-Sustanzi Kimiċi ta' Referenza jintużaw sabiex jiġi stabbilit jekk l-affidabbiltà u l-preċiżjoni ta' metodu simili jew immodifikat propost, ippruvat li huwa strutturalment u funzjonalment simili biżżejjed għall-VRM, jew li jirrappreżenta modifika żgħira ta' wieħed mit-tliet metodi vvalidati, humiex komparabbli jew aqwa minn dawk tal-VRM (2) (8) (16) (23). L-20 Sustanza Kimika ta' Referenza rrakkomandati elenkati fit-Tabella 1 jinkludu sustanzi kimiċi li jirrappreżentaw klassijiet differenti ta' sustanzi kimiċi (jiġifieri kategoriji ta' sustanzi kimiċi bbażati fuq gruppi funzjonali), u jirrappreżentaw il-firxa sħiħa ta' punteġġi ta' irritazzjoni Draize (minn xejn irritanti għal ferm irritanti) Is-sustanzi kimiċi inklużi fil-lista jinkludu għaxar (10) sustanzi kimiċi tal-Kategorija 2 tal-UN GHS/EU CLP u għaxar (10) sustanzi kimiċi mhux kategorizzati, li minnhom tlieta huma sustanzi kimiċi fakultattivi tal-Kategorija 3 tal-UN GHS. Taħt dan il-Metodu ta' Ttestjar, il-Kategorija 3 fakultattiva hija meqjusa bħala Ebda Kategorija. Is-sustanzi kimiċi elenkati fit-Tabella 1 huma magħżula mis-sustanzi kimiċi użati fil-fażi ta' ottimizzazzjoni li segwiet il-prevalidazzjoni u fl-istudju tal-validazzjoni tal-VRM, fir-rigward tal-funzjonalità kimika u l-istat fiżiku (14) (18). Dawn is-Sustanzi Kimiċi ta' Referenza jirrappreżentaw l-inqas għadd ta' sustanzi kimiċi li għandhom jintużaw għall-evalwazzjoni tal-preċiżjoni u l-affidabbiltà ta' metodu simili jew immodifikat propost, iżda ma għandhomx jintużaw għall-iżvilupp ta' metodi ġodda. F'sitwazzjonijiet fejn sustanza kimika elenkata ma tkunx disponibbli, jistgħu jintużaw sustanzi kimiċi oħrajn li

għalihom hemm disponibbli dejta ta' referenza *in vivo* adegwata, prinċipalment mis-sustanzi kimiċi użati fil-fażi ta' ottimizzazzjoni li segwiet il-prevalidazzjoni u fl-istudju tal-validazzjoni tal-VRM. Jekk ikun mixtieq, sustanzi kimiċi oħrajn li jirrappreżentaw klassijiet ta' sustanzi kimiċi oħrajn u li għalihom hemm disponibbli dejta ta' referenza *in vivo* adegwata jistgħu jiżdiedu mal-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza sabiex il-preċiżjoni tal-metodu propost tiġi evalwata aktar.

Tabella 1: Lista Minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza għad-Determinazzjoni tal-Valuri tal-Preċiżjoni u l-Affidabbiltà għal Metodi Simili jew Immodifikati ta' RhE għall-irritazzjoni tal-Ġilda[1]

Sustanza Kimika	Numru tal-CAS	Stat Fiżiku	Punteġġ *in vivo*	Kat. *in vitro* VRM	Kat. *in vivo* tal-UN GHS/EU CLP
1-bromo-4-klorobutan	6940-78-9	Likwidu	0	Kat. 2	Ebda Kat.
ftalat tad-dietil	84-66-2	Likwidu	0	Ebda Kat.	Ebda Kat.
aċidu naftil aċetiku	86-87-3	Solidu	0	Ebda Kat.	Ebda Kat.
fenossi aċetat tal-allil	7493-74-5	Likwidu	0.3	Ebda Kat.	Ebda Kat.
isopropanol	67-63-0	Likwidu	0.3	Ebda Kat.	Ebda Kat.
4-metil-tijo-benżaldeid	3446-89-7	Likwidu	1	Kat. 2	Ebda Kat.
stearat tal-metil	112-61-8	Solidu	1	Ebda Kat.	Ebda Kat.
butirat tal-ettil	5870-93-9	Likwidu	1.7	Ebda Kat.	Ebda Kat.
saliċilat tal-eżil	6259-76-3	Likwidu	2	Ebda Kat.	Ebda Kat.
Ċinnamaldeid	104-55-2	Likwidu	2	Kat. 2	Ebda Kat. (*Kat. 3 Fakultattiva*)[3]
1-dekanol[2]	*112-30-1*	*Likwidu*	*2.3*	*Kat. 2*	*Kat. 2*
aldeid taċ-ċiklamen	103-95-7	Likwidu	2.3	Kat. 2	Kat. 2
1-bromoeżan	111-25-1	Likwidu	2.7	Kat. 2	Kat. 2
2-klorometil-3,5-dimetil-4-metossipiridina HCl	86604-75-3	Solidu	2.7	Kat. 2	Kat. 2
disulfur tad-di-n-propil[2]	*629-19-6*	*Likwidu*	*3*	*Ebda Kat.*	*Kat. 2*
idrossidu tal-potassju (5% soluzzjoni milwiema)	1310-58-3	Likwidu	3	Kat. 2	Kat. 2
benżentijol, 5-(1,1-dimetiletil)-2-metil	7340-90-1	Likwidu	3.3	Kat. 2	Kat. 2
1-metil-3-fenil-1-piperażina	5271-27-2	Solidu	3.3	Kat. 2	Kat. 2
Ettanal	111-71-7	Likwidu	3.4	Kat. 2	Kat. 2
Tetrakloroetilen	127-18-4	Likwidu	4	Kat. 2	Kat. 2

[1] L-għażla tas-sustanzi kimiċi hija bbażata fuq il-kriterji li ġejjin (i), is-sustanzi kimiċi huma disponibbli kummerċjalment; (ii), jirrappreżentaw il-firxa sħiħa ta' punteġġi ta' irritazzjoni Draize (minn xejn irritanti għal ferm irritanti); (iii), għandhom struttura kimika definita sew; (iv), jirrappreżentaw il-funzjonalità kimika użata fil-proċess ta' validazzjoni; u (v), mhumiex assoċjati ma' profil estremament tossiku (eż. karċinoġeniċi jew tossiċi għas-sistema riproduttiva) u mhumiex assoċjati ma' spejjeż projbittivi tar-rimi.

[2] Sustanzi kimiċi irritanti fil-fenek iżda li għalihom hemm evidenza affidabbli li mhumiex irritanti fil-bnedmin (31) (32) (33).

[3] Taħt il-UN GHS, mhux fl-EU CLP

III) Valuri Definiti ta' Affidabbiltà u Preċiżjoni

8. Għall-finijiet tal-istabbiliment tal-affidabbiltà u r-rilevanza ta' metodi proposti simili jew immodifikati li għandhom jiġu trasferiti bejn il-laboratorji, l-20 Sustanza Kimika ta' Referenza fit-Tabella 1 għandhom jiġu ttestjati mill-inqas fi tliet laboratorji. Madankollu, jekk il-metodu propost ser jintuża f'laboratorju wieħed biss ma jkunx meħtieġ ittestjar f'diversi laboratorji għall-validazzjoni. Madankollu huwa essenzjali li dawn l-istudji ta' validazzjoni jiġu evalwati b'mod indipendenti minn entitajiet ta' validazzjoni rikonoxxuti internazzjonalment, bi qbil ma' linji gwida internazzjonali (9). F'kull laboratorju, l-20 Sustanza Kimika ta' Referenza kollha għandhom ikunu ttestjati fi tliet sensiliet ta' testijiet indipendenti magħmula b'lottijiet ta' tessut differenti u f ħinijiet spazjati biżżejjed bejniethom. Kull sensiela ta' testijiet għandha tikkonsisti minn minimu ta' tliet repliki ta' tessut ittestjati fl-istess ħin għal kull sustanza kimika tat-test inkluża, NC u PC.

9. Il-kalkolu tal-valuri tal-affidabbiltà u tal-preċiżjoni tal-metodu propost għandu jsir bil-kunsiderazzjoni tal-erba' kriterji hawn taħt flimkien, filwaqt li jiġi żgurat li l-valuri għall-affidabbiltà u r-rilevanza jiġu kkalkulati b'mod konsistenti u definit minn qabel:

1. Id-dejta minn sensiliet ta' testijiet minn sekwenzi sħaħ ta' sensiliet ta' testijiet biss tikkwalifika għall-kalkolu tal-metodu u tal-varjabbiltà u l-kapaċità ta' previżjoni fil-laboratorju u bejn il-laboratorji (preċiżjoni).

2. Il-klassifikazzjoni finali għandha tinkiseb billi jintuża l-valur medju tal-vijabbiltà fuq is-sensiliet differenti ta' sekwenza sħiħa ta' sensiela ta' testijiet.

3. Id-dejta miksuba għal sustanzi kimiċi li għandhom sekwenzi sħaħ ta' sensiliet ta' testijiet fil-laboratorji parteċipanti kollha biss tikkwalifika għall-kalkolu tal-metodu ta' varjabbiltà bejn il-laboratorji.

4. Il-kalkolu tal-valuri ta' preċiżjoni għandu jsir fuq il-bażi ta' previżjonijiet tal-laboratorju individwali miksuba għall-20 Sustanza ta' Kimika ta' Referenza mil-laboratorji parteċipanti differenti.

F'dan il-kuntest, **sekwenza ta' sensiela ta' testijiet** tikkonsisti fi tliet sensiliet ta' testijiet indipendenti minn laboratorju wieħed għal sustanza kimika tat-test waħda. **Sekwenza sħiħa ta' sensiela ta' testijiet** hija sekwenza ta' sensiela ta' testijiet minn laboratorju wieħed għal sustanza kimika tat-test waħda fejn it-tliet sensiliet ta' testijiet ikunu validi. Dan ifisser li kull sensiela invalida tinvalida sekwenza sħiħa ta' sensiela ta' testijiet ta' tliet sensiliet.

Riproduċibbiltà fil-laboratorju

10. Il-valutazzjoni tar-riproduċibbiltà fil-laboratorju għandha turi konkordanza ta' klassifikazzjonijiet (Kategorija 2 jew Ebda Kategorija tal-UN GHS/EU CLP) miksuba f'sensiliet ta' testijiet differenti u indipendenti tal-20 Sustanza Kimika ta' Referenza f'laboratorju wieħed ugwali għal jew aktar (≥) minn 90 %.

Riproduċibbiltà bejn il-laboratorji

11. Il-valutazzjoni tar-riproduċibbiltà bejn il-laboratorji mhijiex meħtieġa jekk il-metodu propost se jintuża f'laboratorju wieħed biss. Għall-metodi li għandhom jiġu ttrasferiti bejn il-laboratorji, il-konkordanza bejn il-klassifikazzjonijiet (Kategorija 2 jew Ebda Kategorija tal-UN GHS/EU CLP) miksuba f'sensiliet ta' testijiet differenti u indipendenti tal-20 Sustanza

Kimika ta' Referenza preferibbilment minn mill-inqas tliet laboratorji għandha tkun ugwali għal jew aktar (≥) minn 80 %.

Kapaċità ta' previżjoni (preċiżjoni)

12. Il-preċiżjoni (sensittività, speċifiċità u preċiżjoni ġenerali) tal-metodu simili jew immodifikat propost għandha tkun komparabbli jew aqwa minn dik tal-VRM, filwaqt li tiġi kkunsidrata informazzjoni addizzjonali relatata mar-rilevanza fl-ispeċijiet ta' interess (Tabella 2). Is-sensittività għandha tkun ugwali għal jew ogħla (≥) minn 80 % (2) (8) (23). Madankollu, hemm restrizzjoni speċifika oħra li tapplika għas-sensittività tal-metodu *in vitro* propost inkwantu żewġ sustanzi kimiċi tal-Kategorija 2 *in vivo*, *1-dekanol* u *disulfur tad-di-n-propil,* jistgħu jiġu kklassifikati ħażin bħala Ebda Kategorija minn aktar minn laboratorju wieħed parteċipant. L-ispeċifiċità għandha tkun ugwali għal jew ogħla (≥) minn 70 % (2) (8) (23). Mhemmx aktar restrizzjonijiet rigward l-ispeċifiċità tal-metodu *in vitro* propost, jiġifieri, kull laboratorju parteċipant jista' jikklassifika ħażin kwalunkwe sustanza kimika *in vivo* ta' Ebda Kategorija sakemm l-ispeċifiċità finali tal-metodu ta' ttestjar tkun f'firxa aċċettabbli. L-preċiżjoni ġenerali għandha tkun ugwali għal jew ogħla (≥) minn 75 % (2) (8) (23). Għalkemm is-sensittività tal-VRM ikkalkulata għall-20 Sustanza Kimika ta' Referenza elenkati fit-Tabella 1 hija ugwali għal 90 %, il-valur ta' sensittività minimu definit meħtieġ għal kwalunkwe metodu simili jew immodifikat sabiex ikun ikkunsidrat validu huwa stabbilit għal 80 % minħabba li kemm *1-dekanol* (sustanza kimika marġinali) u *disulfur tad-di-n-propil* (negattiv falz tal-VRM) huma magħrufa li mhumiex irritanti fil-bnedmin (31) (32) (33), għalkemm huma identifikati bħala irritanti fit-test fuq il-fenek. Minħabba li l-mudelli tal-RhE huma bbażati fuq ċelloli ta' oriġini mill-bniedem, jistgħu jbassru dawn is-sustanzi kimiċi bħala mhux irritanti (Ebda Katergorija tal-UN GHS/EU CLP).

Tabella 2. Valuri ta' tbassir meħtieġa għas-sensittività, l-ispeċifiċità u l-preċiżjoni ġenerali għal kull metodu simili jew immodifikat sabiex jiġi kkunsidrat validu.

Sensittività	**Speċifiċità**	**Preċiżjoni Ġenerali**
≥ 80%	≥ 70%	≥ 75%

Kriterji ta' Aċċettazzjoni tal-Istudju

13. Huwa possibbli li test wieħed jew aktar fuq sustanza kimika waħda jew aktar ma jissodisfax/jissodisfawx il-kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test għat-test u għas-sustanzi kimiċi ta' kontroll jew ma jkunx/jkunux aċċettabbli għal raġunijiet oħrajn. Biex dejta nieqsa tiġi kkumplimentata, għal kull sustanza kimika ta' test huwa ammissibbli għadd massimu ta' żewġ testijiet oħrajn ("ittestjar mill-ġdid"). B'mod aktar preċiż, minħabba li fil-każ tal-ittestjar mill-ġdid il-PC u l-NC ukoll għandhom ikunu ttestjati fl-istess ħin, jista' jsir għadd massimu ta' żewġ sensiliet ta' testijiet oħra għal kull sustanza kimika tat-test.

14. Huwa konċepibbli li anki wara l-ittestjar mill-ġdid, l-għadd minimu ta' tliet sensiliet ta' testijiet validi meħtieġa għal kull sustanza kimika ttestjata ma jinkisibx għal kull Sustanza Kimika ta' Referenza f'kull laboratorju parteċipant, li jwassal għal matriċi tad-dejta mhux kompluta. F'dawn il-każijiet it-tliet kriterji li ġejjin għandhom jiġu ssodisfati kollha sabiex il-ġabriet tad-dejta jitqiesu aċċettabbli:

1. Kull waħda mill-20 Sustanza Kimika ta' Referenza għandu jkollha mill-inqas sekwenza waħda sħiħa ta' sensiela ta' testijiet.

2. F’kull wieħed minn mill-inqas tliet laboratorji parteċipanti, minimu ta’ 85 % tas-sekwenzi tas-sensiliet ta’ testijiet għandhom ikunu sħaħ (għal 20 sustanza kimika, jiġifieri 3 sekwenzi ta’ sensiela ta’ testijiet invalidi huma permessi f’laboratorju wieħed).

3. Minimu ta’ 90 % tas-sekwenzi kollha ta’ sensiliet ta’ testijiet minn mill-inqas tliet laboratorji għandhom ikunu sħaħ (għal 20 sustanza kimika ttestjati fi tliet laboratorji; jiġifieri sitt sekwenzi ta’ sensiela ta’ testijiet invalidi huma permessi b’kollox)."

3. Il-Kapitoli li ġejjin huma miżjuda

"B.49 Test tal-Mikronukleu taċ-Ċellola Mammifera *In Vitro*

INTRODUZZJONI

1. L-analiżi tal-mikronukleu *in vitro* (MNvit) hija test ta' ġenotossiċità għall-individwazzjoni ta' mikronuklei (MN) fiċ-ċitoplażma ta' ċelloli fl-interfażi. Il-mikronuklei jistgħu joriġinaw minn frammenti ta' kromożomi aċentriċi (jiġifieri li ma għandhomx ċentromer), jew kromożomi sħaħ li ma jistgħux jemigraw lejn il-poli waqt l-istadju ta' anafażi tad-diviżjoni taċ-ċellola. L-analiżi tindividwa l-attività ta' sustanzi kimiċi klastoġeniċi u anewġeniċi (sustanzi u taħlitiet) (1) (2) f'ċelloli li għaddew mid-diviżjoni taċ-ċelloli wara l-esponiment għas-sustanza tat-test. Dan il-Metodu ta' Ttestjar (TM) jippermetti l-użu ta' protokolli bl-inibitur taċ-ċitokalażina B tal-polimerizzazzjoni tal-attina (actin polymerisation inhibitor cytochalasin B, cytoB) u mingħajr dan l-inibitur. Iż-żieda ta' cytoB qabel il-mitożi mmirata tippermetti l-identifikazzjoni u l-analiżi selettiva tal-frekwenza tal-mikronuklei f'ċelloli li temmew mitożi waħda peress li dawn iċ-ċelloli għandhom żewġ nuklei (3) (4). Dan it-TM jippermetti wkoll l-użu ta' protokolli mingħajr imblokkatur taċ-ċitokineżi, sakemm ikun hemm evidenza li l-popolazzjoni ta' ċelloli analizzati għaddiet minn mitożi.

2. Minbarra l-użu tal-analiżi tal-MNvit sabiex jiġu identifikati sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) li jinduċu l-mikronuklei, l-użu ta' imblokkatur taċ-ċitokineżi, it-tikkettar immunokimiku ta' kinetochores, jew l-ibridizzazzjoni b'sondi ċentromeriċi/telomeriċi (ibridizzazzjoni *in situ* ta' fluworexxenza (fluorescence *in situ* hybridisation - FISH)), ukoll jistgħu jipprovdu informazzjoni dwar il-mekkaniżmi ta' ħsara fil-kromożomi u tal-formazzjoni ta' mikronuklei (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Il-proċeduri ta' tikkettar u ibridizzazzjoni jistgħu jintużaw meta jkun hemm żieda fil-formazzjoni ta' mikronuklei u l-investigatur ikun jixtieq jiddetermina jekk iż-żieda kinitx ir-riżultat ta' avvenimenti klastoġeniċi u/jew anewġeniċi.

3. Il-mikronuklei jirrappreżentaw ħsara li ġiet trażmessa lil ċelloli ġġenerati (daughter cells), filwaqt li aberrazzjonijiet tal-kromożomi magħduda fiċ-ċelloli f'metafażi jistgħu ma jiġux trażmessi. Minħabba li l-mikronuklei fiċ-ċelloli fl-interfażi jistgħu jiġu evalwati b'mod relattivament oġġettiv, il-persunal tal-laboratorju jeħtieġ li jiddetermina biss jekk iċ-ċelloli ddividewx u kemm-il ċellola fiha mikronukleu. Għalhekk, il-preparazzjonijiet jistgħu jingħaddu relattivament malajr u l-analiżi tista' tiġi awtomatizzata. Dan jagħmilha prattika li eluf minflok mijiet ta' ċelloli jingħaddu f'kull trattament, biex b'hekk tiżdied il-qawwa tal-analiżi. Fl-aħħar nett, minħabba li l-mikronuklei jistgħu joħorġu minn kromożomi tardivi, hemm il-potenzjal li wieħed jindividwa sustanzi li jinduċu anewplojdi li huma diffiċli li wieħed jistudjahom f'testijiet konvenzjonali tal-aberrazzjoni tal-kromożomi, eż. Linja gwida tal-Ittestjar 473 tal-OECD (Kapitolu B.10 ta' dan l-Anness) (17). Madankollu, l-analiżi tal-MNvit ma tippermettix għad-divrenzjar ta' sustanzi kimiċi li jinduċu poliplojdi minn dawk li jinduċu klastoġeniċità mingħajr tekniki speċjali bħall-FISH deskritta fil-paragrafu 2.

4. L-analiżi tal-MNvit hija metodu *in vitro* li tipikament tuża ċelloli tal-bniedem jew tal-annimali gerriema kkultivati. Hija tipprovdi bażi komprensiva għall-investigazzjoni tal-potenzjal ta' ħsara tal-kromożomi *in vitro* minħabba li jistgħu jiġu individwati kemm l-anewġeni kif ukoll il-klastoġeni.

5. L-analiżi tal-MNvit hija b'saħħitha u effettiva f'varjetà ta' tipi ta' ċelloli, u fil-preżenza jew fin-nuqqas ta' cytoB. Hemm dejta estensiva li tappoġġa l-validità tal-analiżi tal-MNvit permezz ta' diversi linji ta' ċelloli tal-annimali gerriema (CHO, V79, CHL/IU, u L5178Y) u limfoċiti tal-bniedem (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Dawn jinkludu, b'mod partikolari, l-istudji ta' validazzjoni internazzjonali kkoordinati mis-Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22) u r-rapporti tal-Grupp ta' Ħidma Internazzjonali dwar l-Ittestjar tal-Ġenotossiċità (4) (16). Id-dejta disponibbli ġiet evalwata mill-ġdid fi studju ta' validazzjoni retrospettiv skont il-piż tal-evidenza miċ-Ċentru Ewropew għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ECVAM) tal-Kummissjoni Ewropea, u l-metodu tat-test ġie approvat bħala xjentifikament validu mill-Kumitat Xjentifiku Konsultattiv tal-ECVAM (ESAC) (32) (33) (34). Ġie deskritt l-użu tal-linja ta' ċelloli tal-bniedem limfoblastojdi TK6 (35), ċelloli HepG2 (36) (37) u ċelloli primarji tal-Embriju tal-Ħemster Sirjan (38), għalkemm ma ntużawx fi studji ta' validazzjoni.

DEFINIZZJONIJIET

6. Definizzjonijiet użati huma pprovduti f'Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

7. It-testijiet li jsiru *in vitro* ġeneralment ikunu jeħtieġu l-użu ta' sors eżoġenu ta' attivazzjoni metabolika diment li ċ-ċelloli ma jkunux metabolikament kompetenti fir-rigward tas-sustanzi li jkunu qegħdin jiġu ttestjati. Is-sistema eżoġena ta' attivazzjoni metabolika ma timitax għal kollox il-kundizzjonijiet *in vivo*. Għandha tingħata attenzjoni wkoll sabiex jiġu evitati kundizzjonijiet li jwasslu għal riżultati pożittivi artefattwali li ma jirriflettux mutaġeniċità intrinsika, u li jistgħu joħorġu minn fatturi bħal bidliet ċari fil-pH jew osmolalità, jew permezz ta' livelli għoljin ta' ċitotossiċità (39) (40) (41). Jekk is-sustanza sustanza kimika tat-test toħloq bidla fil-pH tal-mezz fil-ħin taż-żieda, il-pH għandu jiġi aġġustat, preferibbilment permezz tal-ibbaffjar tas-soluzzjoni tal-istokk sabiex il-volumi kollha tal-konċentrazzjonijiet kollha tat-test, u għall-kontrolli kollha, jibqgħu l-istess.

8. Biex wieħed janalizza l-induzzjoni tal-mikronuklei, huwa essenzjali li l-mitożi tkun seħħet kemm fil-kultivazzjonijiet ittrattati kif ukoll f'dawk mhux ittrattati. L-iktar stadju informattiv għall-għadd tal-mikronuklei huwa f'ċelloli li temmew mitożi waħda waqt jew wara t-trattament bis-sustanza tat-test.

PRINĊIPJU TAT-TEST

9. Il-kultivazzjonijiet taċ-ċelloli ta' oriġini mill-bniedem jew mill-mammiferi huma esposti għas-sustanza tat-test kemm b'sors eżoġenu ta' attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajr dan is-sors diment li ma jintużawx ċelloli b'kapaċità metabolizzanti adegwata. Sustanzi kimiċi simultanji ta' solvent/mezz (VC) u ta' kontroll pożittiv (PC) huma inklużi fit-testijiet kollha.

10. Waqt jew wara l-esponiment għas-sustanza tat-test, iċ-ċelloli jitkabbru għal perjodu suffiċjenti sabiex il-ħsara fil-kromożomi jew fil-magħżel twassal għall-formazzjoni tal-mikronuklei f'ċelloli fl-interfażi. Għall-induzzjoni tal-anewplojdi, is-sustanza tat-test għandha normalment tkun preżenti waqt il-mitożi. Ċelloli fl-interfażi miġbura u mlewna jiġu analizzati għall-preżenza ta' mikronuklei. Idealment, il-mikronuklei għandhom jingħaddu biss f'dawk iċ-ċelloli li jkunu temmew il-mitożi waqt l-esponiment għas-sustanza tat-test jew waqt il-perjodu ta' wara l-esponiment, jekk jintuża wieħed. F'kultivazzjonijiet li ġew ittrattati b'imblokkatur taċ-ċitokineżi, dan jinkiseb billi jingħaddu biss iċ-ċelloli b'żewġ nuklei. Fin-

nuqqas ta' imblokkatur taċ-ċitokineżi, huwa importanti li jintwera li ċ-ċelloli analizzati aktarx li għaddew mid-diviżjoni taċ-ċelloli waqt jew wara l-esponiment għas-sustanza tat-test. Għall-protokolli kollha, huwa importanti li jintwera li l-proliferazzjoni taċ-ċelloli seħħet kemm fil-kultivazzjonijiet ta' kontroll kif ukoll f'dawk ittrattati, u l-grad ta' ċitotossiċità jew ċitostażi kkawżata mis-sustanza tat-test għandu jiġi vvalutat fil-kultivazzjonijiet (jew f'kultivazzjonijiet paralleli) li jingħaddu għall-mikronuklei.

DESKRIZZJONI TAL-ANALIŻI

Preparazzjonijiet

11. Jistgħu jintużaw limfoċiti primarji kkultivati periferiċi tad-demm tal-bniedem (5) (19) (42) (43) u għadd ta' linji ta' ċelloli tal-annimali gerriema bħal CHO, V79, CHL/IU, u ċelloli L5178Y (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). L-użu ta' linji u tipi oħrajn ta' ċelloli għandu jkun iġġustifikat abbażi tal-prestazzjoni tagħhom murija fl-analiżi, kif deskritt fit-taqsima dwar il-Kriterji ta' Aċċettazzjoni. Minħabba li l-frekwenza tal-isfond tal-mikronuklei tinfluwenza s-sensittività tal-analiżi, huwa rrakkomandat li jintużaw tipi ta' ċelloli bi frekwenza ta' sfond baxxa u stabbli ta' formazzjoni ta' mikronuklei.

12. Il-limfoċiti periferiċi tad-demm tal-bniedem għandhom jinkisbu minn individwi żgħażagħ (ta' madwar 18-35 sena), b'saħħithom, ma jpejpux u li huma magħrufa li reċentement ma kinux esposti għal sustanzi kimiċi ġenotossiċi jew għar-radjazzjoni. Jekk jinġabru ċelloli għall-użu mingħand aktar minn donatur wieħed, l-għadd ta' donaturi għandu jkun speċifikat. Il-frekwenza tal-mikronuklei tiżdied mal-età u din it-tendenza hija aktar ċara fin-nisa milli fl-irġiel (44) u dan għandu jiġi kkunsidrat fl-għażla ta' ċelloli għall-ġbir minn donaturi.

Il-kundizzjonijiet tal-mezzi u tal-kultivazzjoni

13. Kundizzjonijiet xierqa tal-mezz ta' kultivazzjoni u tal-inkubazzjoni (kontenituri ta' kultivazzjoni, konċentrazzjoni ta' CO_2, temperatura, u umdità) għandhom jintużaw għaż-żamma tal-kultivazzjonijiet. Linji u razez ta' ċelloli stabbiliti għandhom jiġu ċċekkjati regolarment għall-istabilità tal-għadd ta' kromożomi modali u n-nuqqas ta' kontaminazzjoni ta' majkoplażma, u ma għandhomx jintużaw jekk ikunu kkontaminati jew jekk l-għadd ta' kromożomi modali jkun inbidel. Il-ħin normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli għall-kundizzjonijiet ta' kultivazzjoni użati fil-laboratorju tal-ittestjar għandu jkun magħruf. Jekk jintuża l-metodu ta' imblukkar taċ-ċitokineżi allura l-konċentrazzjoni tal-inibitur taċ-ċitokineżi għandha tkun ottimizzata għat-tip partikolari taċ-ċellola u għandha tintwera li tipproduċi rendiment tajjeb ta' ċelloli b'żewġ nuklei għall-għadd.

Preparazzjoni tal-kultivazzjonijiet

14. <u>Linji u razez ta' ċelloli stabbiliti:</u> iċ-ċelloli jitnisslu minn kultivazzjonijiet stokkjati, imqiegħda fil-mezz ta' kultivazzjoni f'densità tali li l-kultivazzjonijiet ma jilħqux konfluwenza f'saffi uniċi, u l-kultivazzjonijiet ta' sospensjoni ma jilħqux densità eċċessiva qabel ma jinġabru, u jiġu inkubati f'temperatura ta' 37°C.

15. <u>Limfoċiti:</u> demm sħiħ ittrattat b'antikoagulanti (eż. eparina), jew limfoċiti separati, huma kkultivati fil-preżenza ta' mitoġenu eż. fitoemagglutinina (PHA) qabel l-esponiment għas-sustanza tat-test u cytoB.

Attivazzjoni metabolika

16. Għandhom jintużaw sistemi eżoġeni ta' metabolizzazzjoni meta jintużaw ċelloli b'kapaċità metabolika endoġena inadegwata. Is-sistema li tintuża l-aktar hija frazzjoni postmitokondrijali ssupplimentata b'kofattur (S9) imħejjija mill-fwied ta' annimali gerriema ttrattati b'sustanzi li jinduċu l-enzimi bħall-Aroclor 1254 (45) (46) jew kombinazzjoni ta' fenobarbiton u β-naftoflavon (46) (47) (48) (49). Din il-kombinazzjoni ma tmurx kontra l-Konvenzjoni ta' Stokkolma dwar il-Pollutanti Organiċi Persistenti (50) u r-Regolament (KE) Nru 850/2004 dwar il-Pollutanti Organiċi Persistenti (66) u ntweriet li hija daqstant effettiva daqs l-Aroclor 1254 għall-induzzjoni ta' ossidażi b'funzjoni mħallta (46) (47) (48) (49). Il-frazzjoni S9 tintuża normalment f'konċentrazzjonijiet li jvarjaw minn 1-10 % (v/v) fil-mezz tat-test finali. Il-kundizzjoni ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika tista' tiddependi mill-klassi ta' sustanza kimika li qiegħda tiġi ttestjata u f'ċerti każijiet jista' jkun xieraq li wieħed juża aktar minn konċentrazzjoni waħda ta' S9.

17. Linji ta' ċelloli mfassla ġenetikament li jesprimu enzimi attivanti speċifiċi tal-bniedem jew tal-annimali gerriema jistgħu jeliminaw il-ħtieġa ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika eżoġena, u jistgħu jintużaw bħala ċ-ċelloli tat-test. F'dawn il-każijiet l-għażla tal-linji taċ-ċelloli użati għandha tkun iġġustifikata xjentifikament, eż. skont ir-rilevanza tal-ossidażi b'funzjoni mħallta għall-metaboliżmu tas-sustanza tat-test (51), u r-reazzjoni tagħhom għal klastoġeni u anewġeni magħrufa (ara t-taqsima separata dwar il-Kriterji ta' Aċċettabbiltà). Għandu jkun rikonoxxut li s-sustanza li qiegħda tiġi ttestjata tista' ma tkunx metabolizzata mill-ossidażi b'funzjoni mħallta espressa; f'dan il-każ, ir-riżultati negattivi ma jindikawx li s-sustanza tat-test ma tistax tinduċi mikronuklei.

Preparazzjoni tas-sustanza tat-test

18. Sustanzi kimiċi solidi għandhom jinħallu f'solventi jew mezzi xierqa u dilwiti, jekk ikun xieraq, qabel it-trattament taċ-ċelloli. Sustanzi kimiċi likwidi jistgħu jiżdiedu direttament fis-sistemi tat-test u/jew dilwiti qabel it-trattament. Gassijiet jew sustanzi kimiċi volatili għandhom jiġu ttestjati permezz ta' modifikazzjonijiet xierqa għall-protokolli standard, bħat-trattament f'kontenituri ssiġillati (52) (53). Għandhom jintużaw preparazzjonijiet friski tas-sustanza tat-test sakemm dejta ta' stabilità ma turix li jistgħu jinħażnu.

Kundizzjonijiet tat-test

Solventi/mezzi

19. Is-solvent/mezz ma għandux jirreaġixxi mas-sustanza tat-test, jew ikun inkompatibbli mas-sopravivenza taċ-ċelloli jew maż-żamma tal-attività tal-S9 fil-konċentrazzjoni użata. Jekk jintużaw solventi/mezzi oħrajn minflok dawk stabbiliti sew (eż. ilma, mezz ta' kultivazzjoni taċ-ċelloli, sulfossidu tad-dimetil), l-użu tagħhom għandu jkun appoġġat minn dejta li tindika l-kompatibbiltà tagħhom mas-sustanza tat-test u n-nuqqas ta' tossiċità ġenetika tagħhom. Huwa rrakkomandat li, kull fejn ikun possibbli, l-ewwel għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/mezz likwidu.

L-użu ta' cytoB bħala imblokkatur taċ-ċitokineżi

20. Waħda mill-aktar kunsiderazzjonijiet importanti fil-prestazzjoni tal-analiżi tal-MNvit hija l-iżgurar li ċ-ċelloli magħduda temmew il-mitożi waqt it-trattament jew il-perjodu ta' inkubazzjoni wara t-trattament, jekk jintuża wieħed. CytoB hija s-sustanza li ntużat l-aktar

sabiex timblokka ċ-ċitokineżi minħabba li tinibixxi l-ġbir tal-attina, u b'hekk tipprevjeni s-separazzjoni taċ-ċelloli ġġenerati (daughter cells) wara l-mitożi, li twassal għall-formazzjoni ta' ċelloli b'żewġ nuklei (5) (54) (55). L-għadd tal-mikronuklei, għalhekk, jista' jkun illimitat għal ċelloli li għaddew minn mitożi waqt jew wara t-trattament. L-effett tas-sustanza tat-test fuq il-kinetika tal-proliferazzjoni taċ-ċelloli jista' jitkejjel fl-istess ħin. Is-cytoB għandu jintuża bħala imblokkatur taċ-ċitokineżi meta l-limfoċiti tal-bniedem jintużaw minħabba li l-ħinijiet taċ-ċikli taċ-ċelloli jkunu varjabbli f'kultivazzjonijiet u fost id-donaturi u minħabba li mhux il-limfoċiti kollha jirreaġixxu għall-PHA. Intużaw metodi oħrajn fl-ittestjar ta' linji ta' ċelloli sabiex jiġi stabbilit jekk iċ-ċelloli magħduda nqasmux; dawn huma indirizzati hawn taħt (ara l-paragrafu 26).

21. Il-konċentrazzjoni xierqa ta' cytoB għandha tkun stabbilita mil-laboratorju għal kull tip ta' ċellola sabiex tinkiseb il-frekwenza ottimali ta' ċelloli b'żewġ nuklei fil-kultivazzjonijiet ta' kontroll fis-solvent/mezz. Il-konċentrazzjoni xierqa ta' cytoB normalment tkun bejn 3 u 6 µg/ml.

Il-kejl tal-proliferazzjoni taċ-ċelloli u ċ-ċitotossiċità u l-għażla tal-konċentrazzjonijiet ta' esponiment

22. Meta wieħed jiddetermina l-ogħla konċentrazzjoni ta' sustanza tat-test li għandha tkun ittestjata, il-konċentrazzjonijiet li għandhom il-kapaċità li jipproduċu rispons pożittiv artefattwali, bħal dawk li jipproduċu ċitotossiċità eċċessiva, il-preċipitazzjoni fil-mezz tal-kultivazzjoni, u bidliet ċari fil-pH jew osmolalità (39) (40) (41), għandhom jiġu evitati.

23. Il-kejl tal-proliferazzjoni taċ-ċelloli jsir sabiex ikun żgurat li ċ-ċelloli ttrattati jkunu għaddew minn mitożi waqt l-analiżi u li t-trattamenti jsiru fil-livelli xierqa ta' ċitotossiċità (ara l-Paragrafu 29). Iċ-ċitotossiċità għandha tkun stabbilita b'attivazzjoni metabolika jew mingħajrha f'ċelloli li jeħtieġu attivazzjoni metabolika permezz taż-żieda relattiva fl-għadd taċ-ċelloli (RICC) jew irduppjar relattiv tal-popolazzjoni (RPD) (ara l-Appendiċi 2 għall-formoli) sakemm ma tintużax is-cytoB. Meta tintuża s-cytoB, iċ-ċitotossiċità tista' tkun stabbilita permezz tal-indiċi ta' replikazzjoni (RI) (ara Appendiċi 2 għall-formola).

24. It-trattament tal-kultivazzjonijiet b'cytoB, u l-kejl tal-frekwenzi relattivi ta' ċelloli b'nukleu wieħed, żewġ nuklei jew diversi nuklei fil-kultivazzjoni, jipprovdi metodu eżatt tal-kwantifikazzjoni tal-effett fuq il-proliferazzjoni taċ-ċelloli u l-attività ċitotossika jew ċitostatika ta' trattament (5), u jiżgura li ċelloli li nqasmu waqt jew wara t-trattament biss jiġu magħduda.

25. Fi studji b'cytoB, iċ-ċitostażi/ċitotossiċità tista' tiġi kkwantifikata mill-indiċi ta' proliferazzjoni tal-imblokkatur taċ-ċitokineżi (CBPI) (5) (26) (56) jew tista' tinħareġ mill-RI minn mill-inqas 500 ċellola għal kull kultivazzjoni (ara Appendiċi 2 għall-formuli). Meta s-cytoB jintuża għall-valutazzjoni tal-proliferazzjoni taċ-ċelloli, CBPI jew RI għandhom jiġu stabbiliti minn mill-inqas 500 ċellola għal kull kultivazzjoni. Dan il-kejl fost oħrajn jista' jintuża sabiex tiġi stmata ċ-ċitotossiċità billi jitqabblu l-valuri fil-kultivazzjonijiet ittrattati u ta' kontroll. Il-valutazzjoni ta' indikaturi oħrajn ta' ċitotossiċità (eż. konfluwenza, għadd ta' ċelloli, apoptożi, nekrożi, għadd ta' metafażi) tista' tipprovdi informazzjoni utli.

26. Fi studji mingħajr cytoB, jeħtieġ li jintwera li ċ-ċelloli magħduda fil-kultivazzjoni inqasmu waqt jew wara t-trattament bis-sustanza tat-test, inkella jistgħu jiġu prodotti reazzjonijiet negattivi foloz. Metodi li ntużaw sabiex ikun żgurat li ċ-ċelloli maqsuma qegħdin jingħaddu jinkludu l-inkorporazzjoni u l-individwazzjoni sussegwenti tal-bromodeossiuridina

(BrdU) għall-identifikazzjoni ta' ċelloli li rreplikaw (57), il-formazzjoni ta' kloni meta ċ-ċelloli minn linji ta' ċelloli permanenti jiġu ttrattati u magħduda *in situ* fuq slajd tal-mikroskopju (Indiċi ta' Proliferazzjoni (PI)) (25) (26) (27) (28), jew il-kejl ta' Rduppjar Relattiv tal-Popolazzjoni (RPD) jew Żieda Relattiva fl-Għadd taċ-Ċelloli (RICC) jew metodi oħrajn ippruvati (16) (56) (58) (59) (ara Appendiċi 2 għall-formoli). Il-valutazzjoni ta' indikaturi oħrajn għaċ-ċitotossiċità jew ċitostażi (eż. konfluwenza, għadd ta' ċelloli, apoptożi, nekrożi, għadd ta' metafażi) tista' tipprovdi informazzjoni utli.

27. Għallinqas għandhom jiġu evalwati tliet konċentrazzjonijiet ta' test analizzabbli. Sabiex jinkiseb dan, jista' jkun meħtieġ li jsir l-esperiment permezz ta' għadd akbar ta' konċentrazzjonijiet spazjati viċin xulxin u li tiġi analizzata l-formulazzjoni ta' mikronuklei f'dawk il-konċentrazzjonijiet li jipprovdu l-firxa xierqa ta' ċitotossiċitajiet. Strateġija alternattiva hija li jsir test preliminari ta' ċitotossiċità sabiex tonqos il-firxa għat-test definittiv.

28. L-ogħla konċentrazzjoni għandha timmira li tipproduċi 55 ± 5 % ċitotossiċità. Livelli ogħla jistgħu jinduċu ħsara fil-kromożomi bħala effett sekondarju ta' ċitotossiċità (60). Meta sseħħ ċitotossiċità, il-konċentrazzjonijiet tat-test magħżula għandhom ikopru firxa minn dik li tipproduċi 55 ± 5 % ċitotossiċità, sa ftit li xejn jew l-ebda ċitotossiċità.

29. Jekk ma tkun osservata l-ebda ċitotossiċità jew preċipitat, l-ogħla konċentrazzjoni tat-test għandha tikkorrispondi għal 0.01 M, 5 mg/mL jew 5 μl/mL, skont liema hija l-aktar baxxa. Il-konċentrazzjonijiet magħżula għall-analiżi għandhom, ġeneralment, ikunu separati minn spazju ta' mhux aktar minn 10. Għal sustanzi tat-test li juru kurva ta' konċentrazzjoni-reazzjoni wieqfa, jista' jkun meħtieġ li l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test jiġu spazjati aktar viċin xulxin sabiex il-kultivazzjonijiet fil-firxiet moderati u baxxi tat-tossiċità jkunu magħduda wkoll.

30. Meta s-solubbiltà tkun fattur li jillimita, il-konċentrazzjoni massima, jekk ma tkunx limitata biċ-ċitotossiċità, għandha tkun il-konċentrazzjoni l-aktar baxxa li fiha l-preċipitat minimu jkun viżibbli fil-kultivazzjonijiet, sakemm ma jkunx hemm interferenza bl-għadd. L-evalwazzjoni tal-preċipitazzjoni għandha ssir permezz ta' metodi bħal mikroskopija ħafifa, l-innutar ta' preċipitat li jippersisti, jew li jidher waqt il-kultivazzjoni (sal-aħħar tat-trattament).

Kontrolli

31. Kontrolli simultanji pożittivi u b'solvent/mezz kemm b'attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajrha għandhom ikunu inklużi f'kull esperiment.

32. PC huma meħtieġa sabiex juru l-abbiltà taċ-ċelloli użati, u l-protokoll tat-test, li jiġu identifikati l-klastoġeni u l-anewġeni, u sabiex tkun affermata l-kapaċità metabolika tal-preparazzjoni S9. Il-PC għandu juża indutturi magħrufa ta' formazzjoni ta' mikronuklei f'konċentrazzjonijiet mistennija li jagħtu żidiet żgħar iżda riproduċibbli fuq l-isfond, u li juru s-sensittività tas-sistema ta' ttestjar. Il-konċentrazzjonijiet tal-PC għandhom jintgħażlu b'mod li l-effetti jkunu ċari iżda ma jiżvelawx minnufih lill-qarrej l-identità tal-islajds ikkodifikati.

33. Klastoġenu li jeħtieġ attivazzjoni metabolika (eż. ċiklofosfammid; benżo[a]piren) għandu jintuża sabiex juri kemm il-kompetenza metabolika kif ukoll l-abbiltà tas-sistema tal-ittestjar li tindividwa l-klastoġeni. PC oħrajn jistgħu jintużaw jekk ikunu ġġustifikati. Minħabba li ċerti PC li jeħtieġu attivazzjoni metabolika jistgħu jkunu attivi mingħajr attivazzjoni metabolika eżoġena taħt ċerti kundizzjonijiet ta' trattament jew f'ċerti linji ta'

ċelloli, il-ħtieġa għal attivazzjoni metabolika, u l-attività tal-preparazzjoni S9, għandha tkun ittestjata fil-linja ta' ċelloli magħżula u fil-konċentrazzjonijiet magħżula.

34. Fil-preżent, l-ebda anewġen ma huwa magħruf li jeħtieġ attivazzjoni metabolika għall-attività ġenotossika tiegħu (16). PC aċċettati bħalissa għall-attività anewġenika huma, pereżempju, kolkiċina u vinblastina. Sustanzi kimiċi oħrajn jistgħu jintużaw jekk jinduċu mikronuklei biss, jew primarjament, permezz ta' attività anewġenika. Sabiex tiġi evitata l-ħtieġa għal żewġ PC (għall-klastoġeniċità u l-anewġeniċità) mingħajr attivazzjoni metabolika, il-kontroll tal-anewġeniċità jista' jservi bħala l-PC mingħajr S9, u l-kontroll tal-klastoġeniċità jista' jintuża għall-ittestjar tal-adegwatezza tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika użata. PC kemm għall-klastoġeniċità u l-anewġeniċità għandu jintuża fiċ-ċelloli li ma jeħtiġux S9. Il-PC issuġġeriti huma inklużi fl-Appendiċi 3.

35. L-użu ta' PC relatati mal-klassi tas-sustanzi kimiċi jista' jiġi kkunsidrat, meta jkunu disponibbli sustanzi kimiċi adattati. Il-PC kollha użati għandhom ikunu xierqa għat-tip ta' ċellola u l-kundizzjonijiet ta' attivazzjoni.

36. Kontrolli ta' solvent/mezz għandhom ikunu inklużi għal kull ħin ta' ġbir. Barra minn hekk, NC mhux ittrattati (neqsin minn solvent/mezz) għandhom jintużaw ukoll diment li ma jkunx hemm dejta ta' kontroll storika ppubblikata jew tal-laboratorju li turi li l-ebda effett ġenotossiku jew effett dannuż ieħor ma jiġi kkawżat mis-solvent magħżul fil-konċentrazzjonijiet użati.

PROĊEDURA TAT-TEST

Skeda tat-Trattament

37. Sabiex tkun massimizzata l-probabbiltà tal-identifikazzjoni ta' anewġenu jew klastoġenu li jaġixxu fi stadju speċifiku fiċ-ċiklu taċ-ċelloli, huwa importanti li għadd suffiċjenti ta' ċelloli jiġu ttrattati bis-sustanza tat-test matul l-istadji kollha taċ-ċikli taċ-ċelloli tagħhom. Għalhekk, l-iskeda tat-trattament għal-linji taċ-ċelloli u l-kulturi taċ-ċelloli primarji jistgħu jvarjaw kemmxejn minn dawk għal-limfoċiti, li jitolbu li l-istimulazzjoni mitoġenika tibda ċ-ċiklu taċ-ċelloli tagħhom, u dawn huma kkunsidrati fil-Paragrafi 41-43 (16).

38. Il-kunsiderazzjonijiet teoretiċi, flimkien mal-informazzjoni ppubblikata (18) jindikaw li l-maġġoranza tal-anewġeni u l-klastoġeni ser jiġu identifikati f'perjodu ta' trattament għal żmien qasir ta' 3 sa 6 sigħat fil-preżenza u fin-nuqqas ta' S9, segwiti mit-tneħħija tas-sustanza tat-test u perjodu ta' tkabbir ta' 1.5 – 2.0 ċikli ta' ċelloli (6). Għandhom jittieħdu kampjuni taċ-ċelloli fi żmien ekwivalenti għal madwar 1.5 – 2.0 darba aktar mit-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli (*i.e.* mhux ittrattati) wara l-bidu jew wara t-tmiem tat-trattament (Ara t-Tabella 1). Il-perjodi tat-teħid tal-kampjuni jew tal-irkupru jistgħu jiġu estiżi jekk ikun magħruf jew suspettat li s-sustanza tat-test taffettwa l-perjodu ċikliku taċ-ċelloli (*pereżempju* meta jiġu ttestjati l-analogi nukleożidi).

39. Minħabba ċ-ċitotossiċità potenzjali tal-preparazzjonijiet tal-S9 għaċ-ċelloli mammiferi kkultivati, trattament ta' esponiment estiż ta' 1.5 – 2.0 ċikli ta' ċelloli normali jintuża biss fin-nuqqas ta' S9. Fit-trattament estiż, jiġu offruti għażliet biex jippermettu t-trattament taċ-ċelloli bis-sustanza kimika tat-test fin-nuqqas jew fil-preżenza ta' cytoB. Dawn l-għażliet jindirizzaw is-sitwazzjonijiet li jista' jkun hemm tħassib dwarhom fir-rigward tal-interazzjonijiet possibbli bejn is-sustanza tat-test u s-cytoB.

40. L-iskedi ssuġġeriti għat-trattament taċ-ċelloli huma ppreżentati fit-Tabella 1. Dawn l-iskedi ta' trattament ġenerali jistgħu jiġu mmodifikati skont l-istabilità jew ir-reattività tas-sustanza tat-test jew il-karatteristiċi ta' tkabbir partikolari taċ-ċelloli li jkunu qegħdin jintużaw. It-trattamenti kollha għandhom jibdew u jintemmu waqt li ċ-ċelloli jkunu qegħdin jikbru b'mod esponenzjali. Dawn l-iskedi huma ppreżentati f'aktar dettall fil-paragrafi 41-47 li ġejjin.

Tabella 1. It-trattament taċ-ċelloli u l-perjodi tal-ħsad għall-analiżi tal-MNvit

Limfoċiti, ċelloli primarji u linji ta' ċelloli ttrattati b'cytoB	+ S9	Trattament għal 3-6 sigħat fil-preżenza ta' S9; tneħħija tal-S9 u l-mezz tat-trattament; żieda ta' mezz frisk u cytoB; ħsad ta' 1.5 – 2.0 ċikli ta' ċelloli normali aktar tard.
	– S9 Esponiment qasir	Trattament għal 3-6 sigħat; tneħħija tal-mezz tat-trattament; żieda ta' mezz frisk u cytoB; ħsad ta' 1.5 – 2.0 ċikli ta' ċelloli normali aktar tard.
	– S9 Esponiment estiż	*Għażla A:* Trattament għal 1.5 – 2 ċikli ta' ċelloli normali fil-preżenza tas-cytoB; ħsad fi tmiem il-perjodu tal-esponiment. *Għażla B:* Trattament għal 1.5 – 2.0 ċikli ta' ċelloli normali; tneħħija tas-sustanza tat-test; żieda ta' mezz frisk u cytoB; ħsad ta' 1.5 – 2.0 ċikli ta' ċelloli normali aktar tard.
Linji ta' ċelloli ttrattati mingħajr cytoB (Identiċi għall-iskedi tat-trattament deskritti hawn fuq bl-eċċezzjoni li ma tiżdied ebda cytoB)		

Limfoċiti, ċelloli primarji u linji ta' ċelloli b'cytoB

41. Għal-limfoċiti, l-aktar approċċ effiċjenti huwa li l-esponiment għas-sustanza tat-test jinbeda f'44-48 siegħa wara l-istimulazzjoni tal-PHA, meta tkun telqet is-sinkronizzazzjoni taċ-ċiklu (5). Fl-analiżi inizjali, iċ-ċelloli jiġu ttrattati għal 3 sa 6 sigħat bis-sustanza tat-test fin-nuqqas jew fil-preżenza ta' S9. Il-mezz tat-trattament jitneħħa u jiġi sostitwit b'mezz frisk li jkun fih is-cytoB, u ċ-ċelloli jittieħdu wara 1.5 – 2.0 ċikli taċ-ċelloli normali.

42. Jekk iż-żewġ testijiet inizjali tat-trattament qasir (3-6 sigħat) ikunu negattivi jew ekwivoċi, għandu jintuża trattament ta' esponiment estiż sussegwenti mingħajr S9. Hemm żewġ għażliet ta' trattament li huma disponibbli u ugwalment aċċettabbli. Madankollu, jista'

jkun aktar xieraq li tiġi segwita l-Għażla A għal limfoċiti stimulati fejn it-tkabbir esponenzjali jista' jkun qiegħed jonqos f'96 siegħa wara l-istimulazzjoni. Barra minn hekk, il-kulturi taċ-ċelloli ma għandhomx ikunu laħqu konfluwenza sal-perjodu finali tat-teħid tal-kampjuni fl-Għażla B.

- Għażla A: Iċ-ċelloli jiġu ttrattati bis-sustanza tat-test għal 1.5 – 2.0 ċikli taċ-ċelloli normali, u jittieħdu fl-aħħar tal-perjodu tat-trattament.

- Għażla B: Iċ-ċelloli jiġu ttrattati bis-sustanza tat-test għal 1.5 – 2.0 ċikli taċ-ċelloli normali. Il-mezz tat-trattament jitneħħa u jiġi sostitwit b'mezz frisk, u ċ-ċelloli jittieħdu wara 1.5 - 2.0 ċikli taċ-ċelloli normali addizzjonali.

43. Iċ-ċelloli primarji u l-linji taċ-ċelloli għandhom jiġu ttrattati b'mod simili għal-limfoċiti, ħlief li mhuwiex neċessarju li dawn jiġu stimulati b'PHA għal 44-48 siegħa. Ċelloli oħrajn minbarra l-limfoċiti għandhom ikunu esposti b'tali mod li fiż-żmien tat-terminazzjoni tal-istudju, iċ-ċelloli jkunu għadhom fil-fażi msejħa 'log-phase growth'.

Linji ta' ċelloli mingħajr cytoB

44. Iċ-ċelloli għandhom jiġu ttrattati għal 3 sa 6 sigħat fil-preżenza u fin-nuqqas ta' S9. Il-mezz tat-trattament jitneħħa u jiġi sostitwit b'mezz frisk, u ċ-ċelloli jittieħdu wara 1.5 – 2.0 ċikli taċ-ċelloli normali.

45. Jekk iż-żewġ testijiet inizjali tat-trattament qasir (3-6 sigħat) ikunu negattivi jew ekwivoċi, għandu jintuża trattament ta' esponiment estiż sussegwenti (mingħajr S9). Hemm żewġ għażliet ta' trattament li huma disponibbli, li t-tnejn huma ugwalment aċċettabbli:

- Għażla A: Iċ-ċelloli jiġu ttrattati bis-sustanza tat-test għal 1.5 – 2.0 ċikli taċ-ċelloli normali, u jittieħdu fl-aħħar tal-perjodu tat-trattament.

- Għażla B: Iċ-ċelloli jiġu ttrattati bis-sustanza tat-test għal 1.5 – 2.0 ċikli taċ-ċelloli normali. Il-mezz tat-trattament jitneħħa u jiġi sostitwit b'mezz frisk, u ċ-ċelloli jittieħdu wara 1.5 - 2.0 ċikli taċ-ċelloli normali addizzjonali.

46. Fil-monosaffi, iċ-ċelloli mitotiċi (identifikabbli bħala li huma tondi u maqlugħa mill-wiċċ) jistgħu jkunu preżenti fl-aħħar tat-trattament ta' bejn 3 u 6 sigħat. Minħabba li dawn iċ-ċelloli mitotiċi jistgħu jinqalgħu faċilment, huma jistgħu jintilfu meta jitneħħa l-mezz li jkun fih is-sustanza tat-test. Għandha tingħata attenzjoni għall-ġbir ta' dawn meta jinħaslu l-kulturi, u li dawn jiġu rritornati fil-kulturi, sabiex jiġi evitat li jintilfu ċelloli li jkunu f'mitożi, u li jkunu f'riskju għal mikronuklei, fiż-żmien tal-ħsad.

L-għadd ta' kulturi

47. Għandhom jintużaw kulturi doppji għal kull konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test u għall-mezz/solvent u l-kulturi NC. Fejn tkun tista' tintwera varjazzjoni minima bejn il-kulturi doppji mill-informazzjoni storika tal-laboratorju, jista' jkun aċċettabbli li jintużaw kulturi singoli. Jekk jintużaw kulturi singoli, huwa rakkomandat li jiġi analizzat għadd akbar ta' konċentrazzjonijiet.

Il-ħsad taċ-ċelloli u l-preparazzjoni tal-lametti

48. Kull kultura tiġi maħsuda u pproċessata separatament. Il-preparazzjoni taċ-ċelloli tista' tinvolvi trattament ipotoniku, iżda dan il-pass mhuwiex neċessarju jekk jinkiseb tifrix adegwat taċ-ċelloli b'mod ieħor. Jistgħu jintużaw tekniki differenti fil-preparazzjoni tal-lametti sakemm jinkisbu preparazzjonijiet taċ-ċelloli ta' kwalità għolja għall-għoti tal-punti. Iċ-ċitoplasma taċ-ċelloli għandha tinżamm sabiex tkun tista' ssir l-iskoperta tal-mikronuklei u l-identifikazzjoni affidabbli (fil-metodu cytokinesis-block) taċ-ċelloli binukleati.

49. Il-lametti jistgħu jingħataw il-kulur bl-użu ta' metodi varji, bħal Giemsa jew żebgħat speċifiċi fluworexxenti tad-DNA (59). L-użu ta' kulur speċifiku ta' DNA (*pereżempju* oranġjo akridin (61) jew Hoechst 33258 plus pyronin-Y (62)) jista' jelimina xi wħud mill-prodotti assoċjati mal-użu ta' kulur speċifiku mhux ta' DNA. L-antikorpi antikinetokor, FISH bi probes panċentromeriċi tad-DNA, jew it-tikkettar primed *in situ* bi primers speċifiċi panċentromeriċi, flimkien ma' counterstaining xieraq tad-DNA, jistgħu jintużaw biex jidentifikaw il-kontenuti (kromożomi/framment tal-kromożomi) tal-mikronuklei jekk l-informazzjoni mekkanistika dwar il-formazzjoni tagħhom tkun ta' interess (15)(16). Jistgħu jintużaw metodi oħrajn għal divrenzjar bejn il-klastoġeni u l-anewġeni jekk dawn ikunu wrew li huma effettivi.

Analiżi

50. Il-lametti kollha, inklużi dawk tas-solvent/mezz u l-kontrolli, għandhom ikunu kodifikati b'mod indipendenti qabel l-analiżi mikroskopika. Inkella, il-kampjuni kkodifikati jistgħu jiġu analizzati bl-użu ta' sistema vvalidata u awtomatizzata ta' analiżi tal-immaġini jew ta' analiżi tal-fluss ċitometriku.

51. Fil-kulturi ttrattati b'cytoB, il-frekwenzi mikronuklei għandhom jiġu analizzati mill-inqas f'2000 ċellola binukleata għal kull konċentrazzjoni (mill-inqas 1000 ċellola binukleata għal kull kultura; żewġ kulturi għal kull konċentrazzjoni). Jekk jintużaw kulturi singoli, għandhom jingħaddu mill-inqas 2000 ċellola binukleata għal kull konċentrazzjoni minn dik il-kultura. Jekk għall-għoti tal-punti f'kull konċentrazzjoni jkunu disponibbli sostanzjalment inqas minn 1000 ċellola binukleata għal kull kultura, jew 2000 f'każ li tintuża kultura singola, u jekk ma tiġi osservata ebda żieda sinifikanti fil-mikronuklei, it-test għandu jiġi ripetut bl-użu ta' aktar ċelloli, jew f'konċentrazzjonijiet inqas tossiċi, skont xi jkun l-aktar xieraq. Għandha tingħata attenzjoni sabiex ma jingħaddux ċelloli binukleati b'forom irregolari jew fejn iż-żewġ nuklei jkunu jvarjaw ħafna fid-daqs; lanqas ma għandhom iċ-ċelloli binukleati jiġu mħawdin maċ-ċelloli multinukleati mifruxa ħażin. Ċelloli li jkun fihom aktar minn żewġ nuklei ewlenin ma għandhomx jiġu analizzati għall-mikronuklei, minħabba li l-frekwenza bażika tal-mikronukleu tista' tkun ogħla f'dawn iċ-ċelloli (63) (64) L-għadd taċ-ċelloli mononukleati huwa aċċettabbli jekk is-sustanza tat-test turi li tinterferixxi mal-attività tas-cytoB.

52. Fil-linji ta' ċelloli analizzati mingħajr trattament tas-cytoB, il-mikronuklei għandhom jingħaddu mill-inqas f'2000 ċellola għal kull konċentrazzjoni (mill-inqas 1000 ċellola għal kull kultura; żewġ kulturi għal kull konċentrazzjoni). Fejn tintuża kultura waħda biss għal kull konċentrazzjoni, għandhom jingħaddu mill-inqas 2000 ċellola minn dik il-kultura.

53. Meta tintuża s-cytoB, għandhom jiġu stabbiliti CBPI jew RI sabiex tiġi vvalutata l-proliferazzjoni taċ-ċelloli (ara l-Appendiċi 2) bl-użu ta' mill-inqas 500 ċellola għal kull kultura. Meta t-trattamenti jitwettqu fin-nuqqas ta' cytoB, huwa essenzjali li tiġi pprovduta

evidenza li ċ-ċelloli li jkunu qegħdin jingħaddu għaddew minn proliferazzjoni, kif diskuss fil-Paragrafi 24-27.

Kriterji ta' aċċettabilità

54. Laboratorju li jipproponi li juża l-analiżi tal-MNvit deskritta fit-TM għandu juri l-kapaċità tiegħu li josserva b'mod affidabbli u preċiż sustanzi kimiċi ta' attività anewġenika u klastoġenika magħrufa, b'attivazzjoni metabolika u mingħajrha, kif ukoll sustanzi kimiċi negattivi, bl-użu tas-sustanzi kimiċi ta' referenza fl-Appendiċi 3. Bħala evidenza tal-abbiltà tiegħu li jwettaq dan it-TM b'mod korrett, il-laboratorju għandu jipprovdi evidenza li ċ-ċelloli li jkunu qegħdin jingħaddu għal formazzjoni mikronuklea jkunu temmew diviżjoni nukleari waħda jekk it-test jitwettaq mingħajr l-użu ta' cytoB.

55. Is-sustanzi kimiċi fl-Appendiċi 3 huma rrakkomandati biex jintużaw bħala sustanzi kimiċi ta' referenza. Jistgħu jiġu inklużi sustanzi kimiċi sostituti jew addizzjonali jekk l-attività tagħhom tkun magħrufa u jekk jinduċu mikronuklei permezz tal-istess mekkaniżmi ta' azzjoni, u jekk dawn juru li huma rilevanti għas-sustanzi kimiċi li għandhom jiġu ttestjati bl-użu tal-proċedura MNvit. Ġustifikazzjoni tista' tinkludi studju ta' validazzjoni li japplika varjetà wiesgħa ta' sustanzi jew iffokat fuq spettru idjaq ibbażat fuq il-klassi kimika tas-sustanza tat-test jew il-mekkaniżmu ta' dannu li jkun qiegħed jiġi studjat.

56. Il-kontroll tas-solvent/mezz u l-kulturi mhux ittrattati għandhom jagħtu frekwenzi ta' mikronuklei konsistenti u riproduċibbilment baxxi (tipikament 5-25 mikronukleu/1000 ċellola għat-tipi taċ-ċelloli identifikati fil-paragrafu 11). Tipi oħrajn ta' ċelloli jista' jkollhom firxiet differenti ta' reazzjonijiet li għandhom jiġu stabbiliti meta jiġu vvalidati biex jintużaw fl-analiżi tal-MNvit. L-informazzjoni minn kontroll negattiv, solvent u PC għandha tintuża biex tistabbilixxi l-firxiet tal-kontroll storiku. Dawn il-valuri għandhom jintużaw sabiex tiġi deċiża l-adegwatezza tal-NC/PC simultanju għal esperiment.

57. Jekk għall-analiżi jiġu proposti bidliet żgħar fil-protokoll (*eż.* l-użu ta' tekniki ta' għoti ta' punti awtomatizzati minflok manwali; l-użu ta' tip ta' ċellola ġdida) l-effikaċja tal-bidla għandha tintwera qabel ma l-protokoll immodifikat ikun jista' jitqies bħala aċċettabbli biex jintuża. It-turija tal-effikaċja tinkludi dimostrazzjoni li jistgħu jiġu osservati l-mekkaniżmi ewlenin tal-ksur tal-kromożomi u l-ksib jew it-telf tagħhom, u li jistgħu jinkisbu riżultati pożittivi u negattivi xierqa għall-klassi tas-sustanza individwali, jew il-firxa wiesgħa ta' sustanzi, li għandhom jiġu ttestjati.

INFORMAZZJONI U RAPPURTAR

It-trattament tar-riżultati

58. Jekk tintuża t-teknika cytokinesis-block, huma biss il-frekwenzi taċ-ċelloli binukleati b'mikronuklei (indipendenti mill-għadd ta' mikronuklei għal kull ċellola) li għandhom jintużaw fl-evalwazzjoni tal-induzzjoni tal-mikronuklei. L-għadd tan-numri ta' ċelloli b'mikronuklea waħda, b'żewġ mikronuklei jew b'aktar mikronuklei jista' jipprovdi informazzjoni utli, iżda mhuwiex obbligatorju.

59. Għandhom jiġu stabbiliti miżuri simultanji ta' ċitotossiċità u/jew ċitostażi għall-kulturi kollha ttrattati jew ta' kontroll tas-solvent/mezz (58). Is-CBPI jew l-RI għandhom jiġu kkalkolati għall-kulturi kollha ttrattati u ta' kontroll bħala kejl tad-dewmien taċ-ċiklu taċ-

ċelloli meta jintuża l-metodu cytokinesis-block. Fin-nuqqas ta' cytoB, għandhom jintużaw l-RPD, l-RICC jew il-PI (ara l-Appendiċi 2).

60. Għandha tiġi pprovduta informazzjoni dwar il-kultura individwali. Barra minn hekk, l-informazzjoni kollha għandha tinġabar fil-qosor f'forma ta' tabella.

61. Sustanzi kimiċi li jinduċu mikronuklei fl-analiżi tal-MNvit jistgħu jagħmlu dan minħabba li jinduċu ksur tal-kromożomi, telf tal-kromożomi jew kombinazzjoni tat-tnejn. Tista' tintuża analiżi ulterjuri li tuża antikorpi antikinetokor, ċentromeri speċifiċi fi probes *in situ* jew metodi oħrajn sabiex jiġi stabbilit jekk il-mekkaniżmu tal-induzzjoni tal-mikronuklei huwiex dovut għal attività klastoġenika u/jew anewġenika.

Evalwazzjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

62. Ma hemm ebda ħtieġa għal verifika permezz ta' ttestjar addizzjonali ta' reazzjoni pożittiva jew negattiva ċara. Ir-riżultati ekwivoċi jistgħu jiġu kkjarifikati permezz ta' analiżi ta' 1000 ċellola oħra mill-kulturi kollha sabiex jiġi evitat it-telf tal-blinding. Jekk dan l-approċċ ma jsolvix ir-riżultat, ikunu jridu jsiru aktar testijiet. Il-modifika tal-parametri ta' studju fuq firxa wiesgħa jew dejqa ta' kondizzjonijiet, kif xieraq, għandha tiġi kkunsidrata fl-esperimenti ta' segwitu. Il-parametri ta' studju li jistgħu jiġu mmodifikati jinkludu l-ispazjar tal-konċentrazzjoni tat-test, l-għażla taż-żmien tat-trattament u l-ħsad taċ-ċelloli, u/jew il-kondizzjonijiet tal-attivazzjoni metabolika.

63. Hemm bosta kriterji biex jiġi stabbilit riżultat pożittiv, bħal ma hija żieda relatata mal-konċentrazzjoni jew żieda statistikament sinifikanti fl-għadd ta' ċelloli li fihom mikronuklei. L-ewwel għandha tiġi kkunsidrata r-rilevanza bijoloġika tar-riżultati. Il-kunsiderazzjoni ta' jekk il-valuri osservati humiex fi ħdan jew barra l-firxa ta' kontroll storiku tista' tipprovdi gwida fl-evalwazzjoni tas-sinifikat bijoloġiku tar-reazzjoni. Bħala għajnuna fil-valutazzjoni tar-riżultati tat-testijiet (65) jistgħu jintużaw metodi ta' statistika. Madankollu, ir-riżultati tat-testijiet statistiċi għandhom jiġu vvalutati fir-rigward tar-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni. Fatturi oħrajn li għandhom jiġu kkunsidrati huma r-riproduċibbiltà u l-informazzjoni storika.

64. Għalkemm kważi l-esperimenti kollha jagħtu riżultati ċari pożittivi jew negattivi, f'każijiet rari l-informazzjoni ssettjata ma tippermettix li jsir ġudizzju definittiv dwar l-attività tas-sustanza tat-test. Ir-reazzjonijiet jistgħu jibqgħu ekwivoċi jew inċerti irrispettivament mill-għadd ta' drabi li jkun ripetut l-esperiment.

65. Ir-riżultati pożittivi mill-analiżi tal-MNvit jindikaw li s-sustanza tat-test toħloq ksur tal-kromożomi jew telf tal-kromożomi fiċ-ċelloli mammiferi kkulturati. Ir-riżultati negattivi jindikaw li, taħt il-kondizzjonijiet tat-test użati, is-sustanza tat-test ma toħloq ebda ksur tal-kromożomi u/jew ksib jew telf ta' ċelloli mammiferi kkulturati.

Rapport tat-Test

66. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi mill-inqas l-informazzjoni li ġejja, jekk tkun rilevanti għat-twettiq tal-istudju:

Sustanza kimika tat-test:

- informazzjoni dwar l-identifikazzjoni u n-Numru tar-Reġistru tal-Chemical Abstract Services (CAS) u n-Numru tal-KE;

- in-natura u l-purità fiżika;

- il-karatteristiċi fiżikokimiċi rilevanti għat-twettiq tal-istudju;

- ir-reattività tas-sustanza kimika tat-test mas-solvent/mezz jew il-mezzi tal-kultura taċ-ċelloli;

Solvent/Mezz:

- ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-mezz;

- is-solubilità u l-istabilità tas-sustanza tat-test fis-solvent/fil-mezz;

Ċelloli:

- it-tip u s-sors taċ-ċelloli użati;

- l-adattabilità tat-tip ta' ċelloli użati;

- in-nuqqas ta' majkoplasma, jekk applikabbli;

- informazzjoni dwar it-tul taċ-ċiklu taċ-ċelloli, l-irduppjar taż-żmien jew l-indiċi tal-proliferazzjoni;

- fejn jintużaw limfoċiti, is-sess, l-età u l-għadd ta' donaturi tad-demm, jekk applikabbli;

- fejn jintużaw limfoċiti, jekk id-demm sħiħ jew il-limfoċiti separati humiex esposti;

- l-għadd ta' passaġġi, jekk applikabbli;

- il-metodi użati għall-manutenzjoni tal-kulturi taċ-ċelloli, jekk applikabbli;

- in-numru modali tal-kromożomi;

- iż-żmien normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli (kontroll negattiv);

Kondizzjonijiet tat-Test:

- l-identità taċ-ċitokineżi li timblokka s-sustanza (eż. cytoB), jekk tintuża, u l-konċentrazzjoni tagħha, flimkien mat-tul tal-esponiment taċ-ċelloli;

- ir-raġuni għall-għażla tal-konċentrazzjonijiet u l-għadd ta' kulturi, inklużi informazzjoni dwar iċ-ċitotossiċità u l-limitazzjonijiet tas-solubilità, jekk ikunu disponibbli;

- il-kompożizzjoni tal-mezzi, il-konċentrazzjoni tas-CO_2, jekk applikabbli;

- il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test;

- il-konċentrazzjoni (u/jew il-volum) tal-mezz u s-sustanza tat-test miżjuda;

- it-temperatura u l-ħin tal-inkubazzjoni;

- it-tul tat-trattament;

- il-ħin tal-ħsad wara t-trattament;

- id-densità taċ-ċelloli waqt l-injettar, jekk applikabbli;

- it-tip u l-kompożizzjoni tas-sistema tal-attivazzjoni metabolika, inklużi l-kriterji tal-aċċettabilità;

- is-sustanzi kimiċi ta' kontroll pożittiv u l-kontrolli negattivi;

- il-metodi tal-preparazzjoni tal-lametti u t-teknika użata għall-għoti tal-kulur;

- il-kriterji għall-identifikazzjoni tal-mikronuklei;

- l-għadd ta' ċelloli analizzati;

- il-metodi għall-kejl taċ-ċitotossiċità;

- kwalunkwe informazzjoni supplimentari rilevanti għaċ-ċitotossiċità;

- il-kriterji sabiex l-istudji jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi;

- il-metodu/i tal-analiżi statistika użata;

- il-metodi, bħall-użu ta' antikorp kinetochore, sabiex jikkaratterizzaw jekk il-mikronuklei fihomx kromożomi sħaħ jew frammentati, jekk applikabbli;

Ir-riżultati:

- il-kejl taċ-ċitotossiċità użata, *eż.* CBPI jew RI fil-każ tal-metodu cytokinesis-block; RICC, RPD jew PI meta ma jintużawx il-metodi ta' cytokinesis-block; osservazzjonijiet oħrajn meta applikabbli, *eż.* konfluwenza taċ-ċelloli, apoptożi, nekrożi, l-għadd tal-metafażi, il-frekwenza taċ-ċelloli binukleati;

- sinjali ta' preċipitazzjoni;

- informazzjoni dwar il-pH u l-osmolalità tal-mezz tat-trattament, jekk ikun stabbilit;

- definizzjoni taċ-ċelloli aċċettabbli għall-analiżi;

- id-distribuzzjoni taċ-ċelloli mononukleati, binukleati u multinukleati jekk jintuża l-metodu cytokinesis-block;

- l-għadd ta' ċelloli b'mikronuklei mogħtija separatament għal kull kultura ttrattata u kkontrollata, u jekk hux minn ċelloli binukleati jew mononukleati, fejn xieraq;

- ir-relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u r-reazzjoni, fejn possibbli;

- informazzjoni kimika simultanja (konċentrazzjonijiet u solventi) dwar il-kontroll negattiv (solvent/mezz) u pożittiv;

- informazzjoni kimika storika dwar kontroll negattiv (solvent/mezz) u pożittiv, bil-meded, il-mezzi u l-intervall standard ta' devjazzjoni u kunfidenza (*eż.* 95%);

- analiżi statistika; il-valuri p, jekk ikun hemm;

Diskussjoni tar-riżultati

Konklużjonijiet

LETTERATURA

(1) Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.,* 392, 1-4.

(2) Parry, J.M. u 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. u 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., Surralles, J., von der Hude, W. u 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. u 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. u Tucker, J.D. (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.,* 13, 34-43.

(8) Eastmond, D.A. u 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. u 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. u Natarajan, A.T. (1993), The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesis,* 8, 329-334.

(11) Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. u 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. u Lindholm, C. (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization, *Mutagenesis,* 8, 519-525.

(13) Eastmond, D.A, Rupa, D.S. u 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. u 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. u 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. u 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,* Linja Gwida tat-Test Nru 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq: [www.oecd.org/env/testguidelines]

(18) Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G. u 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. u 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. u 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. u 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. u 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. u 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. u 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. u 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 fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Res.,* 410, 81-116.

(26) Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. u 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. u 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. u 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. u 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. u 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., u 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 ta' Novembru 2006, Disponibbli fuq: [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, Disponibbli fuq: [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. u 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. u Knasmeuller, S. (2002), Fumonisin B_1 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. u Majer, B.J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge, *Toxicol.,* 198, 315-328. .

(38) Gibson, D.P., Brauninger, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. u 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. u 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. u 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. u 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. u Zijno, A. (2001), HUman MicroNucleus Project: international bażi tad-dejta 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. u 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. u 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. u 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. u 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. u Philpot, R.M. (eds), *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(49) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. u 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). Disponibbli fuq: [http://www.pops.int/]

(51) Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M. u 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. u McCooey, K.T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, *In:* Tice, R.R., Costa, D.L. u 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. u 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., u Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.,* 521, 103-112.

(56) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. u Wakata, A. (2004), Corrigendum to "Report from the *in vitro* micronucleus assay working group", *Mutation Res.,* 564, 97-100.

(57) Pincu, M., Bass, D. u Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.,* 139, 61-65.

(58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. u Kirkland, D. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Res.,* 655, 1-3.

(59) Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. u 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., u 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., u Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 u Pyronin Y, *Mutation Res.,* 120, 269-275.

(63) Hayashi, M., Sofuni, T. u 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. u 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. u 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) Ir-Regolament (KE) Nru 850/2004 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tad-29 ta' April 2004 dwar pollutanti organiċi persistenti u li jemenda d-Direttiva 79/117/KEE, ĠU L 229, 30.4.2004, p. 5.

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Anewġenu: kwalunkwe sustanza jew proċess li, meta jinteraġġixxu mal-komponenti taċ-ċiklu tad-diviżjoni taċ-ċellola mitotika u mejotika, iwasslu għal anewplojdija f'ċelloli jew organiżmi.

Anewplojdija: kwalunkwe devjazzjoni mill-għadd ta' diplojdi (jew aplojdi) normali ta' kromożomi minn kromożomu wieħed jew minn aktar minn kromożomu wieħed, iżda mhux mis-sett(ijiet) kollu/kollha ta' kromożomi (poliplojdija).

Apoptożi: mewta taċ-ċelloli kkaratterizzati minn serje ta' passi li jwasslu għal diżintegrazzjoni taċ-ċelloli fil-partikoli mwaħħlin mal-membrana li jiġu mbagħad eliminati permezz ta' fagoċitożi jew permezz ta' tixrid.

Proliferazzjoni taċ-ċelloli: żieda fl-għadd ta' ċelloli bħala riżultat ta' diviżjoni mitotika taċ-ċelloli.

Ċentromer: reġjun tad-DNA ta' kromożomu wieħed fejn iż-żewġ kromatidi jinżammu flimkien u li fuqu hemm imwaħħlin ġenb ma' ġenb iż-żewġ kinetokori.

Klastoġen: kull sustanza jew proċess li tikkawża aberrazzjonijiet kromosomali strutturali fil-popolazzjoni ta' ċelloli jew organiżmi.

Ċitokineżi: il-proċess ta' diviżjoni taċ-ċelloli minnufih wara mitożi sabiex jifforma żewġ ċelloli żgħar, fejn kull waħda jkun fiha nukleu wieħed.

Indiċi ta' Proliferazzjoni Blokk taċ-Ċitokineżi (Cytokinesis-Block Proliferation index (CBPI)): il-proporzjon ta' ċelloli tat-tieni diviżjoni fil-popolazzjoni ttrattata fir-rigward tal-kontroll mhux ittrattat (ara Appendiċi 2 għall-formula).

Ċitostażi: inibizzjoni tat-tkabbir taċ-ċelloli (ara Appendiċi 2 għall-formula).

Ċitotossiċità: effetti ta' ħsara għall-istruttura jew għall-funzjoni taċ-ċelloli, li fl-aħħar mill-aħħar jikkawżaw il-mewta taċ-ċelloli.

Ġenotossiċità: terminu ġenerali li jinkludi kull tip ta' ħsara fid-DNA jew kromożoma, inkluż ksur, riarranġamenti tal-adduttorji, mutazzjonijiet, aberrazzjonijiet tal-kromożomi, u anewplojdija. Mhux it-tipi kollha ta' effetti ġenotossiċi jirriżultaw f'mutazzjonijiet jew ħsara fil-kromożomi stabbli.

Ċelloli interfażi: ċelloli li mhumiex fil-fażi mitotika.

Kinetochore: struttura li fiha l-proteini li tingħaqad fiċ-ċentromer ta' kromożoma fejn il-fibri 'spindle' jassoċjaw waqt id-diviżjoni taċ-ċelloli, u dan jippermetti moviment ordnat tal-kromożomi li jfaqqsu (daughter chromosomes) għall-poli taċ-ċelloli li jfaqqsu (daughter cells).

Mikronuklei: nuklei żgħar, separati minn u addizzjonali għan-nuklei prinċipali ta' ċelloli, prodotti waqt it-telofażi ta' mitożi jew mejożi permezz frammenti ta' kromożomi li jibqa' jew kromożomi sħaħ.

Mitożi: diviżjoni tan-nukleu taċ-ċelloli li normalment jinqasam f'profażi, prometafażi, metafażi, anafażi u telofażi.

Indiċi mitotiku: il-proporzjon ta' ċelloli fil-metafażi diviżi bl-għadd totali ta' ċelloli osservati f'popolazzjoni ta' ċelloli; indikazzjoni tal-ammont ta' proliferazzjoni ta' ċelloli ta' dik il-popolazzjoni.

Mutaġeniku: jipproduċi bidla ereditarja ta' sekwenza(i) tal-pari tal-bażi tad-DNA f'ġeni jew tal-istruttura tal-kromożomi (aberrazzjonijiet tal-kromożomi).

Nondisġunzjoni: nuqqas min-naħa tal-kromatidi f'pari milli jinfirdu u jissegregaw ruħhom sew sabiex jiżviluppaw ċelloli żgħar, u dan jirriżulta f'ċelloli żgħar b'għadd anormali ta' kromożomi.

Poliplojdija: aberrazzjonijiet numeriċi tal-kromożomi f'ċelloli jew organiżmi li jinvolvu sett(ijiet) sħiħ(sħaħ) ta' kromożomi, meta mqabbla mal-kromożomu jew kromożomi individwali (anewplojdija).

Indiċi ta' Proliferazzjoni (PI): metodu għall-kejl taċ-ċitotossiċità meta ma tintużax cytoB (ara Appendiċi 2 għall-formula).

Żieda Relattiva fl-Għadd taċ-Ċelloli (Relative Increase in Cell Count - RICC): metodu għall-kejl taċ-ċitotossiċità meta ma tintużax cytoB (ara Appendiċi 2 għall-formula).

Irduppjar Relattiv tal-Popolazzjoni (Relative Population Doubling - RPD): metodu għall-kejl taċ-ċitotossiċità meta ma tintużax cytoB (ara Appendiċi 2 għall-formula).

Indiċi tar-Replikazzjoni (RI): il-proporzjon taċ-ċikli tad-diviżjoni taċ-ċelloli mwettqa f'kultura ttrattata, fir-rigward tal-kontroll mhux trattat, matul il-perjodu ta' esponiment u l-irkupru (ara Appendiċi 2 għall-formula).

Sustanza kimika tat-test (li ssir referenza għaliha wkoll bħala s-sustanza tat-test): Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan it-TM.

Appendiċi 2

FORMOLI GĦAL VALUTAZZJONI TAĊ-ĊITOTOSSIĊITÀ

1. ***Meta tintuża cytoB***, l-evalwazzjoni taċ-ċitotossiċità għandha tkun ibbażata fuq l-Indiċi ta' Profilerazzjoni Blokk taċ-Ċitokineżi (**Cytokinesis-Block Proliferation Index - CBPI)** jew l-**Indiċi Replikattiv (Replicative Index - RI)** (16) (58). Is-CBPI jindika l-għadd medju ta' ċikli taċ-ċelloli għal kull ċellola matul il-perjodu ta' esponiment għal cytoB, u jista' jintuża biex jikkalkula l-proliferazzjoni taċ-ċelloli. L-RI jindika l-għadd relattiv ta' nuklei fil-kulturi ttrattati meta mqabbel mal-kulturi ta' kontroll u jista' jintuża biex jikkalkula l-% taċ-ċitostażi:

$$\% \text{ ta' Ċitostażi} = 100 - 100\{(CBPI_T - 1) \div (CBPI_C - 1)\}$$

U:

T = kultura tat-trattament kimiku bi prova

C = kultura ta' kontroll tal-mezz

Meta:

$$\textbf{CBPI} = \frac{((\text{Nru ta' ċelloli mononukleati}) + (2 \times \text{Nru ta' ċelloli binukleati}) + (3 \times \text{Nru ta' ċelloli multinukleati}))}{(\text{Numru totali ta' ċelloli})}$$

Għaldaqstant, CBPI ta' 1 (iċ-ċelloli kollha huma mononukleati) huwa ekwivalenti għal ċitostażi ta' 100%.

$$\text{Ċitostażi} = 100\text{-RI}$$

$$\textbf{RI} = \frac{((\text{Nru ta' ċelloli binukleati}) + (2 \times \text{Nru ta' ċelloli multinukleati})) \div (\text{Numru totali ta' ċelloli})_T}{((\text{Nru ta' ċelloli binukleati}) + (2 \times \text{Nru ta' ċelloli multinukleati})) \div (\text{Numru totali ta' ċelloli})_C} \times 100$$

T= kulturi ttrattati

C= kulturi ta' kontroll

2. B'hekk, RI ta' 53 % ifisser li, meta mqabbel mal-għadd ta' ċelloli li jkunu nqasmu biex jiffurmaw ċelloli binukleati u multinukleati fil-kultura ta' kontroll, 53 % biss ta' dan l-għadd ġew diviżi fil-kultura trattata, jiġifieri ċitostażi ta' 47 %.

3. ***Meta ma tintużax cytoB***, hija rrakkomandata evalwazzjoni taċ-ċitotossiċità fuq il-bażi taż-**Żieda Relattiva fl-Għadd taċ-Ċelloli (Relative Increase in Cell Counts - RICC)** jew fuq l-Ir**duppjar tal-Popolazzjoni Relattiva (Relative Population Doubling - RPD)** (58), minħabba li t-tnejn iqisu l-proporzjon tal-popolazzjoni taċ-ċelloli li tkun iddividiet ruħha.

$$\textbf{RICC} = \frac{\text{(Żieda fl-għadd ta' ċelloli fil-kulturi ttrattati (finali – bidu))}}{\text{(Żieda fl-għadd ta' ċelloli fil-kulturi ta' kontroll (finali – bidu))}} \times 100$$

$$\textbf{RPD} = \frac{\text{(Nru ta' rduppjar fil-Popolazzjoni fil-kulturi ttrattati)}}{\text{(Nru ta' rduppjar fil-Popolazzjoni fil-kulturi ta' kontroll)}} \times 100$$

fejn:

Irduppjar tal-popolazzjoni = [log (Numru ta' ċelloli wara t-trattament ÷ Numru ta' ċelloli inizjali)] ÷ log 2

4. B'hekk, RICC, jew RPD ta' 53 % jindika 47 % ċitotossiċità/ċitostażi.

5. Billi jintuża **Indiċi ta' Proliferazzjoni (Proliferation Index - PI)**, iċ-ċitotossiċità tista' tiġi vvalutata pemrezz tal-għadd (scoring) tan-numru ta' kloni li jikkonsistu f'ċellola 1 (cl1), 2 ċelloli (cl2), 3 sa 4 ċelloli (cl4) u 5 sa 8 ċelloli (cl8)

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

6. Il-PI ntuża bħala parametru siewi u affidabbli taċ-ċitotossiċità wkoll għal linji ta' ċelloli kkulturati *in situ* fin-nuqqas ta' cytoB (25)(26)(27)(28).

Appendiċi 3

SUSTANZI KIMIĊI TA' REFERENZA RRAKKOMANDATI GĦALL-VALUTAZZJONI TAL-PRESTAZZJONI[1]

Kategorija	Sustanza Kimika	Nru tal-CAS	Nru tal-KE
1. Klastoġeni attivi mingħajr attivazzjoni metabolika			
	Ċitosina arabinosida	147-94-4	205-705-9
	Mitomiċina C	50-07-7	200-008-6
2. Klastoġeni li jeħtieġu attivazzjoni metabolika			
	Benżo(a)piren	50-32-8	200-028-5
	Ċiklofosfammid	50-18-0	200-015-4
3. Anewġeni			
	Kolkiċina	64-86-8	200-598-5
	Vinblastina	143-67-9	205-606-0
4. Sustanzi negattivi			
	Di-(2-etileżil)ftalat	117-81-7	204-211-0
	Aċidu nalidissiku	389-08-2	206-864-7
	Piren	129-00-0	204-927-3
	Klorur tas-sodju	7647-14-5	231-598-3

[1] Is-sustanzi kimiċi ta' referenza huma s-sustanzi kimiċi rrakkomandati għall-użu. Is-sostituzzjoni jew iż-żieda ta' sustanzi kimiċi fil-lista ta' sustanzi kimiċi ta' referenza tista' ssir jekk l-attività tagħhom tkun magħrufa u jekk huma jinduċu lill-mikronuklei bl-istess mekkaniżmi ta' azzjoni, u jekk jintwerew li huma rilevanti għas-sustanzi kimiċi li jkunu sejrin jiġu ttestjati permezz tal-proċedura MNvit. Skont x'ikun l-għan, il-ġustifikazzjoni tista' tinkludi wkoll studju ta' validazzjoni li juża firxa wiesgħa ta' sustanzi jew iffukat fuq spettru iktar dejjaq ibbażat fuq il-klassi tas-sustanza kimika jew il-mekkaniżmu ta' ħsara li jkun qiegħed jiġi studjat.

B.50 Sensitizzazzjoni tal-Ġilda: Analiżi tan-Nodi tal-Limfa Lokali: DA

INTRODUZZJONI

1. Il-Linji gwida tal-OECD għall-Ittestjar tas-Sustanzi Kimiċi u l-Metodi ta' Ttestjar tal-UE bbażati fuqhom jiġu analizzati minn żmien għal żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku, ħtiġijiet regolatorji li jinbidlu, u kunsiderazzjonijiet dwar il-benessri tal-annimali. L-ewwel Metodu tat-Test (TM) (B.42) għad-determinazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda fil-ġurdien, l-Analiżi tan-Nodi tal-Limfa Lokali (Local Lymph Node Assay - LLNA; Linja gwida 429 tat-Test tal-OECD) ġie rivedut (1). Id-dettalji tal-validazzjoni tal-LLNA u analiżi tax-xogħol assoċjat ġew ippubblikati (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Fl-LLNA, tintuża t-timidina jew jojdu radjoisotopiku biex titkejjel il-proliferazzjoni tal-limfoċiti u għaldaqstant, l-analiżi għandha użu limitat fejn l-akkwiżizzjoni, l-użu jew l-eliminazzjoni tar-radjuattività huma problematiċi. L-LLNA: DA (żviluppat minn Daicel Chemical Industries, Ltd.) huwa modifikazzjoni mhux radjuattiva għal-LLNA, li tikkwantifika l-kontenut tat-trifosfat tal-adenożina (adenosine triphosphate, ATP) permezz ta' bijoluminexxenza bħala indikatur tal-proliferazzjoni tal-limfoċiti. Il-metodu ta' ttestjar LLNA: DA ġie vvalidat u analizzat u rakkomandat minn panil internazzjonali ta' analiżi minn pari bħala utli għall-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi sensitizzanti u mhux sensitizzanti, b'ċerti limitazzjonijiet (10) (11) (12) (13). Dan it-TM huwa mfassal għall-valutazzjoni tal-potenzjal tas-sustanzi kimiċi li jikkawżaw sensitizzazzjoni tal-ġilda (sustanzi u taħlitiet) fl-annimali. Kapitolu B.6 ta' dan l-Anness u Linja Gwida 406 tat-Test OECD jużaw fniek tal-Indi, b'mod partikolari t-test ta' massimizzazzjoni tal-fniek tal-Indi u t-test Buehler (14). L-LLNA (Kapitolu B.42 ta' dan l-Anness; Linja Gwida 429 tat-Test OECD) u ż-żewġ modifikazzjonijiet mhux radjuattivi, LLNA: DA (Kapitolu B.50 ta' dan l-Anness; Linja Gwida 442 A tat-Test OECD) u LLNA: BrdU-ELISA (Kapitolu B.51 ta' dan l-Anness; Linja Gwida 442 B tat-Test OECD), kollha jipprovdu vantaġġ fuq it-testijiet tal-fniek tal-Indi f'B.6 u fil-Linja Gwida 406 tat-Test OECD (14) f'termini ta' tnaqqis u rfinar tal-użu tal-annimali.

2. B'mod simili għal-LLNA, l-LLNA: DA tistudja l-fażi ta' induzzjoni ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda u tipprovdi dejta kwantitattiva adattata għall-valutazzjoni tad-doża u r-reazzjoni. Barra minn hekk, abilità li jinkixfu sensitizzaturi tal-ġilda mingħajr il-ħtieġa li tintuża radjutikketta għad-DNA telimina l-potenzjal għal esponiment fuq il-post tax-xogħol għal kwistjonijiet ta' radjuattività u ta' rimi ta' skart. Min-naħa tiegħu, dan jista' jippermetti għall-użu miżjud ta' ġrieden għall-individwazzjoni ta' sensitizzaturi tal-ġilda, li jnaqqas ulterjorment l-użu tal-fniek tal-Indi għal testijiet għal potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tat-Test OECD) (14).

DEFINIZZJONIJIET

3. Definizzjonijiet użati huma pprovduti f'Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

4. L-LLNA: DA huwa metodu tal-LLNA modifikat għall-identifikazzjoni tal-potenzjal ta' sustanzi kimiċi li jikkawżaw sensitizzazzjoni fil-ġilda, b'limitazzjonijiet speċifiċi. Dan mhux neċessarjament jimplika li fil-każijiet kollha, l-LLNA: DA għandha tintuża minflok it-testijiet fuq il-fniek tal-Indi (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tat-test OECD) (14), iżda pjuttost li l-analiżi għandha l-istess mertu u tista' tintuża bħala alternattiva li fiha r-riżultati pożittivi u negattivi ġeneralment ma jkunux jeħtieġu aktar konferma (10) (11). Il-laboratorju tal-ittestjar

għandu jikkunsidra l-informazzjoni disponibbli kollha fuq is-sustanza tat-test qabel iwettaq l-istudju. Din l-informazzjoni għandha tinkludi l-identità u l-istruttura kimika tas-sustanza tat-test; il-karatteristiċi fiżikokimiċi tagħha; ir-riżultati ta' kwalunkwe test ta' tossiċità *in vitro* jew *in vivo* fuq is-sustanza tat-test; u dejta tossikoloġika dwar sustanzi kimiċi strutturalment relatati. Din l-informazzjoni għandha titqies sabiex wieħed jiddetermina jekk l-LLNA: DA huwiex adattat għas-sustanza (minħabba n-nuqqas ta' kompatibbiltà ta' tipi limitati ta' sustanzi kimiċi mal-LLNA: DA [ara paragrafu 5]) u sabiex tgħin fl-għażla tad-doża.

5. L-LLNA: DA huwa metodu *in vivo* u, b'konsegwenza ta' dan, ma jeliminax l-użu tal-annimali fil-valutazzjoni ta' attività ta' sensitizzazzjoni ta' kuntatt allerġiku. Huwa għandu, madankollu, il-potenzjal li jnaqqas l-għadd ta' annimali meħtieġa għal dan il-għan meta mqabbel mat-testijiet fuq il-fniek tal-Indi (B.6; Linja Gwida 406 tat-Test tal-OECD) (14). Barra minn hekk, l-LLNA: DA toffri rfinar sostanzjali (inqas uġigħ u dwejjaq) fil-mod kif l-annimali jintużaw għal provi ta' sensitizzazzjoni ta' kuntatt allerġiku, minħabba li b'differenza mill-B.6 u mil-Linja Gwida 406 tat-Test tal-OECD, l-LLNA: DA ma jeħtieġx li reazzjonijiet ta' sensittività eċċessiva dermali indotti mill-isfida jiġu indikati. Minkejja l-vantaġġi tal-LLNA: DA fuq B.6 u l-Linja Gwida 406 tat-Test OECD (14), hemm xi limitazzjonijiet li jistgħu jeħtieġu l-użu ta' B.6 u l-Linja Gwida 406 tat-Test OECD (eż. l-ittestjar ta' ċerti metalli, sejbiet pożittivi foloz b'ċerti irritanti tal-ġilda [bħal xi sustanzi tat-tip tensjoattivi] (6) (1 u l-Kapitolu B.42 f'dan l-Anness), solubilità tas-sustanza tat-test). Barra minn hekk, il-klassijiet ta' sustanzi kimiċi jew sustanzi li fihom gruppi funzjonali li ntwerew li jaġixxu bħala konfonditturi potenzjali (16) jistgħu jeħtieġu l-użu ta' testijiet fuq il-fniek tal-Indi (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tat-Test OECD (14)). Limitazzjonijiet li ġew identifikati għal-LLNA (1, u Kapitolu B.42 f'dan l-Anness) ġew rakkomandati sabiex japplikaw ukoll għal-LLNA: DA (10). Barra minn hekk, l-użu tal-LLNA: DA ma jkunx xieraq għal sustanzi ta' ttestjar li jaffettwaw il-livelli tal-ATP (eż. sustanzi li jiffunzjonaw bħala inibituri tal-ATP) jew dawk li jaffettwaw il-kejl preċiż ta' ATP intraċellolari (eż. il-preżenza ta' enzimi ta' degradazzjoni tal-ATP, il-preżenza ta' ATP ekstraċellolari fin-nodi tal-limfa). Minbarra dawn il-limitazzjonijiet identifikati, l-LLNA: DA għandu jkun applikabbli għall-ittestjar ta' kwalunkwe sustanza diment li ma jkunx hemm karatteristiċi assoċjati ma' dawn is-sustanzi li jistgħu jinterferixxu mal-eżattezza tal-LLNA: DA. Barra minn hekk, għandha tingħata kunsiderazzjoni għall-possibilità ta' riżulatati pożittivi tal-limitu meta jinkisbu valuri ta' Indiċi ta' Stimulazzjoni (SI) ta' bejn 1.8 u 2.5 (ara l-paragrafi 31-32). Dan huwa bbażat fuq il-bażi ta' dejta ta' validazzjoni ta' 44 sustanza li jużaw SI ≥ 1.8 (ara paragrafu 6) li għalihom, l-LLNA: DA identifika b'mod korrett it-32 sensitizzatur tal-LLNA, iżda b'mod inkorrett identifika tlieta minn 12-il nonsensitizzaturi tal-LLNA b'valuri tal-SI ta' bejn 1.8 u 2.5 (jiġifieri linja tal-limitu pożittiva) (10). Madankollu, minħabba li l-istess sett ta' dejta ntuża għall-issettjar tal-valuri SI u għall-kalkolu tal-karatteristiċi ta' tbassir tat-test, ir-riżultati ddikjarati jistgħu jkunu stima eċċessiva tal-karatteristiċi ta' tbassir reali.

PRINĊIPJU TA' DAN IL-METODU TA' TTESTJAR

6. Il-prinċipju bażiku wara l-LLNA: DA huwa li s-sensitizzaturi jikkawżaw il-proliferazzjoni ta' limfoċiti fin-noduli tal-limfa li jsaffu s-sit tal-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Din il-proliferazzjoni hija proporzjonata mad-doża u mal-qawwa tal-allerġen applikat u tipprovdi mezz sempliċi ta' kif wieħed jikseb kejl kwantitattiv ta' sensitizzazzjoni. Il-proliferazzjoni titkejjel billi wieħed iqabbel il-proliferazzjoni medja f'kull grupp tat-test mal-proliferazzjoni medja fil-grupp ta' kontroll ittrattati bil-mezzi (VC). Il-proporzjon tal-proliferazzjoni medja f'kull grupp ittrattat ma' dak fil-grupp VC simultanju, imsejjaħ l-SI, jiġi stabbilit, u għandu jkun ≥1.8 qabel ma tkun meħtieġa evalwazzjoni ulterjuri tas-sustanza tat-test bħala sensitizzatur potenzjali tal-ġilda. Il-proċeduri deskritti hawnhekk huma bbażati fuq

l-użu tal-kejl tal-kontenut ta' ATP b'bijoluminexxenza (magħrufa li tikkorrelata mal-għadd ta' ċelloli ħajjin) (17) sabiex jiġi indikat għadd miżjud ta' ċelloli ta' proliferazzjoni fin-nodi tal-limfa awrikulari li jnixxu (18) (19). Il-metodu bijoluminexxenti juża l-enzima luċiferażi biex jikkatalizza l-formazzjoni tad-dawl minn ATP u luċiferin skont ir-reazzjoni li ġejja:

$$ATP + Luciferin + O_2 \xrightarrow{Luciferase} Oxyluciferin + AMP + PP_i + CO_2 + Dawl$$

L-intensità tad-dawl emess hija relatata b'mod lineari mal-konċentrazzjoni tal-ATP u hija mkejla permezz ta' luminometru. L-analiżi ta' luċiferin-luċiferażi hija metodu sensittiv għall-kwantifikazzjoni tal-ATP użata f'firxa wiesgħa ta' applikazzjonijiet (20).

DESKRIZZJONI TAL-ANALIŻI

Għażla tal-ispeċi tal-annimali

7. Il-ġurdien huwa l-ispeċi tal-għażla għal dan it-test. Studji ta' validazzjoni għal-LLNA: DA twettqu esklussivament bir-razza CBA/J li għaldaqstant hija kkunsidrata r-razza ppreferuta (12) (13). Jintużaw ġrieden nisa adulti żgħar, li huma nulliparużi u mhumiex tqal. Fil-bidu tal-istudju, l-annimali għandu jkollhom bejn 8 ġimgħat u 12-il ġimgħa, u l-varjazzjoni fil-piż tal-annimali għandha tkun minima u ma taqbiżx l-20 % tal-piż medju. Inkella, jistgħu jintużaw razez oħrajn u ġrieden irġiel meta tkun iġġenerata biżżejjed dejta li turi li ma jeżistux differenzi sinifikanti speċifiċi għar-razez u/jew għas-sess fir-reazzjoni għal-LLNA: DA.

Kundizzjoinijiet ta' fejn jinżammu u x'jieklu

8. Il-ġrieden għandhom jinżammu fi gruppi (21), sakemm ma tingħatax loġika xjentifika adegwata għat-tqegħid tal-ġrieden f'gaġeġ individwali. It-temperatura tal-kamra tal-annimali sperimentali għandha tkun ta' 22 ± 3ºC. Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-inqas 30 % u preferibbilment ma taqbiżx is-70 %, għajr waqt it-tindif tal-kamra, il-mira għandha tkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, u s-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, jistgħu jintużaw id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb.

It-tħejjija tal-annimali

9. L-annimali għandhom jintgħażlu b'mod aleatorju, immarkati sabiex ikunu jistgħu jiġu identifikati individwalment (iżda mingħajr l-ebda forma ta' mmarkar fil-widnejn), u miżmuma fil-gaġeġ tagħhom għal mill-inqas ħamest ijiem qabel ma jibda d-dożar sabiex ikunu jistgħu jidraw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju. Qabel il-bidu tat-trattament, l-annimali kollha jiġu eżaminati sabiex ikun żgurat li huma ma jkollhom l-ebda feriti osservabbli fuq il-ġilda.

It-tħejjija tas-soluzzjonijiet għad-dożar

10. Is-sustanzi kimiċi solidi għandhom jinħallu jew jiġu sospiżi f'solventi/mezzi u dilwiti, jekk ikun xieraq, qabel l-applikazzjoni fuq il-widna tal-ġrieden. Is-sustanzi kimiċi likwidi jistgħu jiġu applikati waħedhom jew dilwiti qabel id-dożar. Is-sustanzi kimiċi li ma jinħallux, bħal dawk li naraw ġeneralment fl-apparat mediku, għandhom ikunu soġġetti għal estrazzjoni eżaġerata f'solvent adattat sabiex jiżvelaw il-kostitwenti kollha li jistgħu jiġu

estratti għall-ittestjar qabel jiġu applikati fuq il-widna tal-ġrieden. Is-sustanzi tat-test għandhom jitħejjew kuljum sakemm id-dejta dwar l-istabilità ma turix li jistgħu jinħażnu.

Il-verifika tal-affidabbiltà

11. Sustanzi kimiċi ta' kontroll pożittiv (PC) jintużaw sabiex tintwera prestazzjoni xierqa tal-analiżi billi jirreaġixxu b'sensittività adegwata u riproduċibbli għal sustanza tat-test sensitizzanti li għaliha l-kobor tar-reazzjoni huwa kkaratterizzat sew. L-inklużjoni ta' PC simultanju hija rrakkomandata għaliex din turi l-kompetenza tal-laboratorju biex iwettaq b'suċċess kull analiżi u tippermetti l-valutazzjoni u t-tqabbil tar-riproduċibbiltà fil-laboratorju u bejn il-laboratorji. Xi awtoritajiet regolatorji jeħtieġu wkoll PC għal kull studju u għaldaqstant, l-utenti huma mħeġġa jikkonsultaw mal-awtoritajiet rilevanti qabel iwettqu l-LLNA: DA. Għalhekk, l-użu ta' rutina ta' PC simultanju huwa rrakkomandat sabiex tiġi evitata l-ħtieġa ta' aktar ittestjar fuq l-annimali sabiex jintlaħqu tali rekwiżiti li jistgħu jinħolqu mill-użu ta' PC perjodiku (ara l-paragrafu 12). Il-PC għandha tipproduċi reazzjoni tal-LLNA: DA pożittiva f'livell ta' esponiment li mistenni jagħti żieda fl-SI > 1.8 fuq il-grupp ta' kontroll negattiv (NC). Id-doża tal-PC għandha tintgħażel b'mod li ma tikkawżax irritazzjoni eċċessiva fil-ġilda jew tossiċità sistemika u l-induzzjoni hija riproduċibbli iżda mhux eċċessiva (jiġifieri SI > 10 ikun jitqies eċċessiv). PC ippreferuti huma 25 % eżil ċinnamaldeid (Numru tal-Chemical Abstracts Service [CAS] 101-86-0) u 25 % ewġenol (numru tal-CAS 97-53-0,) fl-aċetun: żejt taż-żebbuġa (4:1, v/v). Jista' jkun hemm ċirkostanzi fejn, minħabba ġustifikazzjoni adegwata, jistgħu jintużaw PCs oħrajn, li jissodisfaw il-kriterji ta' hawn fuq.

12. Filwaqt li l-inklużjoni ta' grupp ta' PC simultanju hija rrakkomandata, jista' jkun hemm sitwazzjonijiet fejn l-ittestjar perjodiku (jiġifieri f'intervalli ≤ 6 xhur) tal-PC jista' jkun adegwat għal-laboratorji li jagħmlu l-LLNA: DA b'mod regolari (jiġifieri jagħmlu l-LLNA: DA fi frekwenza ta' mhux inqas minn darba fix-xahar) u għandhom bażi tad-dejta ta' PC storika stabbilita li turi l-kapaċità tal-laboratorju biex jikseb riżultati riproduċibbli u eżatti b'PCs. Profiċjenza adegwata bl-LLNA: DA tista' tintwera b'suċċess billi jiġu ġġenerati riżultati pożittivi konsistenti bil-PC f'mill-inqas 10 testijiet indipendenti li jsiru f'perjodu ta' żmien raġonevoli (jiġifieri inqas minn sena waħda).

13. Grupp ta' PC simultanju għandu dejjem ikun inkluż meta jkun hemm bidla fil-proċedura tal-LLNA: DA (eż. bidla fil-persunal imħarreġ, bidla fil-materjali tal-metodu tat-test u/jew fir-reaġenti, bidla fit-tagħmir tal-metodu tat-test, bidla fis-sors tal-annimali tat-test), u dawn il-bidliet għandhom jiġu ddokumentati fir-rapporti tal-laboratorju. Għandu jiġi kkunsidrat l-impatt ta' dawn il-bidliet fuq l-adegwatezza tal-bażi tad-dejta storika stabbilita qabel ma tiġi deċiża l-ħtieġa li tkun stabbilita bażi tad-dejta storika ġdida sabiex tiddokumenta l-konsistenza fir-riżultati tal-PC.

14. Ir-riċerkaturi għandhom ikunu konxji li d-deċiżjoni li jsir studju tal-PC fuq bażi perjodika minflok fl-istess ħin għandha konsegwenzi fuq l-adegwatezza u l-aċċettabbiltà tar-riżultati negattivi ta' studju ġġenerati mingħajr PC simultanju waqt l-intervall bejn kull studju tal-PC perjodiku. Pereżempju, jekk jinkiseb riżultat negattiv falz fl-istudju tal-PC perjodiku, ir-riżultati negattivi tas-sustanza tat-test miksuba fl-intervall bejn l-aħħar studju tal-PC perjodika aċċettabbli u l-istudju tal-PC perjodika mhux aċċettabbli jistgħu jkunu dubjużi. L-implikazzjonijiet ta' dawn l-eżiti għandhom ikunu kkunsidrati b'attenzjoni meta jkun deċiż jekk għandhomx ikunu inklużi PCs simultanji jew li jsiru biss PCs perjodiċi. Għandu jiġi kkunsidrat ukoll l-użu ta' inqas annimali fil-grupp ta' PC simultanju meta dan ikun

iġġustifikat xjentifikament u jekk il-laboratorju juri, fuq dejta storika speċifika għal-laboratorju, li jistgħu jintużaw inqas ġrieden (22).

15. Għalkemm il-PC għandu jiġi ttestjat f'mezz li huwa magħruf li jeliċita reazzjoni konsistenti (eż. l-aċetun: żejt taż-żebbuġa; 4:1, v/v), jista' jkun hemm ċerti sitwazzjonijiet regolatorji li fihom it-testijiet b'mezz mhux regolari (formulazzjoni klinika/kimikament rilevanti) ikunu meħtieġa wkoll (23). Jekk il-PC simultanju jiġi ttestjat f'mezz differenti mis-sustanza tat-test, allura għandu jiġi inkluż VC separat għall-PC simultanju.

16. F'każijiet fejn ikunu qegħdin jiġu vvalutati sustanzi tat-test ta' klassi speċifika ta' sustanzi kimiċi jew firxa ta' reazzjonijiet, is-sustanzi ta' referenza jistgħu jkunu utli wkoll sabiex juru li l-metodu ta' ttestjar qed jaħdem sew sabiex jinstab il-potenzjal tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' dawn it-tipi ta' sustanzi. Is-sustanzi ta' referenza adattati għandu jkollhom il-karatteristiċi li ġejjin:

- xebh strutturali u funzjonali mal-klassi ta' sustanzi tat-test li qegħdin jiġu ttestjati;
- karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufa;
- dejta ta' appoġġ mil-LLNA: DA;
- dejta ta' appoġġ minn mudelli oħrajn ta' annimali u/jew mill-bnedmin.

IL-PROĊEDURA TAT-TEST

Għadd ta' annimali u livelli tad-doża

17. Għal kull grupp ta' dożi għandhom jintużaw tal-inqas erba' annimali, b'minimu ta' tliet konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test, flimkien ma' grupp ta' NC simultanju ttrattat biss bil-mezz għas-sustanza tat-test, u PC (simultanja jew reċenti, ibbażata fuq il-politika tal-laboratorju fl-ikkunsidrar tal-paragrafi 11-15). Għandu jiġi kkunsidrat l-ittestjar ta' dożi multipli tal-PC, b'mod speċjali meta wieħed jittestja l-PC fuq bażi intermittenti. Apparti n-nuqqas ta' trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-gruppi ta' kontroll għandhom jiġu mmaniġġjati u trattati b'mod identiku bħall-annimali fil-gruppi tat-trattament.

18. L-għażla tad-doża u tal-mezz għandha tkun ibbażata fuq ir-rakkomandazzjonijiet mogħtija fir-referenzi (2) u (24). Dożi konsekuttivi normalment jintgħażlu minn sensiela xierqa ta' konċentrazzjonijiet bħal 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2.5 %, 1 %, 0.5 %, eċċ. Loġika xjentifika adegwata għandha takkumpanja l-għażla tas-sensiela ta' konċentrazzjonijiet użati. L-informazzjoni tossikoloġika kollha eżistenti (eż. tossiċità akuta u irritazzjoni fil-ġilda) u l-informazzjoni strutturali u fiżikokimika dwar is-sustanza tat-test ta' interess (u/jew sustanzi relatati strutturalment) għandhom jiġu kkunsidrati meta jkunu disponibbli, fl-għażla tat-tliet konċentrazzjonijiet konsekuttivi biex b'hekk l-ogħla konċentrazzjoni timmassimizza l-esponiment filwaqt li tevita t-tossiċità sistemika u/jew l-irritazzjoni lokali eċċessiva fil-ġilda (24) (25). Fin-nuqqas ta' informazzjoni bħal din, jista' jkun meħtieġ test inizjali qabel l-iskrinjar (ara l-paragrafi 21-24).

19. Il-mezz ma għandux jinterferixxi ma' jew jinfluwenza r-riżultat tat-test u għandu jintgħażel fuq il-bażi tal-massimmizzazzjoni tas-solubbiltà sabiex tinkiseb l-ogħla konċentrazzjoni li tista' tinkiseb filwaqt li tiġi prodotta soluzzjoni/sospensjoni adattata għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Il-mezzi rakkomandati huma aċetun: żejt taż-żebbuġa (4:1, v/v), N,N-dimetilformammid, metiletilketon, propilen glikol, u dimetilsulfossidu (6) iżda

jistgħu jintużaw oħrajn jekk tingħata loġika xjentifika suffiċjenti. F'ċerti sitwazzjonijiet, jista' jkun meħtieġ li jsir użu minn solvent kimikament rilevanti jew mill-formulazzjoni kummerċjali li fiha s-sustanza tat-test hija kkummerċjalizzata bħala kontroll addizzjonali. Għandha tingħata attenzjoni partikolari sabiex ikun żgurat li s-sustanzi idrofiliċi jkunu inkorporati f'sistema ta' mezzi, li xxarrab il-ġilda u ma ċċarċarx mal-ewwel, permezz tal-inkorporazzjoni ta' sustanzi li jħollu xierqa (eż. 1% Pluronic® L92). Għalhekk, mezzi likwidi għalkollox għandhom jiġu evitati.

20. L-ipproċessar ta' noduli tal-limfa minn ġrieden individwali jippermetti l-valutazzjoni tal-varjabbiltà bejn l-annimali u tqabbil statistiku tad-differenza bejn is-sustanza tat-test u l-kejl tal-grupp VC (ara paragrafu 33). Barra minn hekk, il-valutazzjoni tal-possibbiltà li jitnaqqas l-għadd ta' ġrieden fil-grupp PC hija fattibbli meta tinġabar dejta dwar annimali individwali (22). Barra minn hekk, ċerti awtoritajiet regolatorji jitolbu l-ġbir ta' dejta dwar annimali individwali. Ġbir regolari ta' dejta dwar annimali individwali jipprovdi vantaġġ mil-lat tal-benesseri tal-annimal billi jevita ttestjar doppju li jkun meħtieġ li kieku r-riżultati tas-sustanza tat-test li tkun inġabret oriġinarjament b'xi mod (eż. permezz ta' dejta miġbura dwar l-annimali) kellhom jiġu kkunsidrati aktar tard mill-awtoritajiet regolatorji ma' rekwiżiti oħrajn (eż. dejta individwali dwar l-annimali).

Test ta' qabel l-iskrinjar

21. Fin-nuqqas ta' informazzjoni sabiex tkun stabbilita l-ogħla doża li għandha tiġi ttestjata (ara paragrafu 18), għandu jsir test ta' qabel l-iskrinjar sabiex jiġi definit il-livell ta' doża xierqa li għandha tiġi ttestjata fl-LLNA: DA. L-iskop tat-test ta' qabel l-iskrinjar huwa li jipprovdi gwida għall-għażla tal-livell tad-doża massima li għandha tintuża fl-istudju ewlieni tal-LLNA: DA, meta l-informazzjoni dwar il-konċentrazzjoni li tikkawża tossiċità sistemika (ara paragrafu 24) u/jew irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda (ara paragrafu 23) ma tkunx disponibbli. Il-livell massimu tad-doża ttestjata għandu jkun 100 % tas-sustanza tat-test għal-likwidi jew il-konċentrazzjoni massima possibbli għas-solidi jew għas-sospensjonijiet.

22. It-test ta' qabel l-iskrinjar isir taħt l-istess kundizzjonijiet tal-istudju ewlieni tal-LLNA: DA, ħlief għall-fatt li ma hemmx valutazzjoni tal-proliferazzjoni tan-noduli tal-limfa u li jistgħu jintużaw inqas annimali għal kull grupp ta' doża. Huwa ssuġġerit li jintuża annimal wieħed jew tnejn għal kull grupp ta' doża. Il-ġrieden kollha jiġu osservati kuljum għal kwalunkwe sinjal kliniku ta' tossiċità sistemika jew irritazzjoni lokali fis-sit tal-applikazzjoni. Il-piżijiet tal-ġisem jiġu ddokumentati qabel it-test u wara li jintemm (Jum 8). Iż-żewġ widniet ta' kull ġurdien jiġu osservati għall-eritema u jingħataw punteġġ skont it-Tabella 1 (25). Jittieħed il-kejl tal-ħxuna tal-widna permezz ta' gejġ ta' ħxuna (eż. mikrometru diġitali jew gejġ tal-ħxuna Peacock Dial) f'Jum 1 (qabel id-doża), f'Jum 3 (madwar 48 siegħa wara l-ewwel doża), f'Jum 7 (24 siegħa qabel it-tmiem) u f'Jum 8. Barra minn hekk, f'Jum 8, il-ħxuna tal-widna tista' tiġi stabbilita permezz ta' determinazzjonijiet tal-piż bl-immarkar tal-widnejn, li għandu jsir wara li l-annimali jinqatlu b'mod uman. L-irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda hija indikata b'punteġġ ta' eritema ≥3 u/jew ħxuna tal-widna ta' ≥25 % fi kwalunkwe jum tal-kejl (26) (27). L-ogħla doża magħżula għall-istudju ewlieni tal-LLNA: DA tkun id-doża l-aktar baxxa li jmiss fis-sensiela ta' konċentrazzjonijiet ta' qabel l-iskrinjar (ara paragrafu 18) li ma tikkawżax tossiċità sistemika u/jew irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda.

<u>**Tabella 1:**</u> Punteġġi għall-Eritema

Osservazzjoni	Punteġġ
L-ebda eritema	0
Ftit li xejn eritema (bil-kemm tidher)	1
Eritema definita sew	2
Eritema moderata sa severa	3
Eritema severa (ħmura qawwija) sa formazzjoni ta' tessut oħxon u danneġġjt li jipprevjeni l-klassifikazzjoni tal-eritema	4

23. Minbarra żieda ta' 25 % fil-ħxuna tal-widna (26) (27), intużat ukoll żieda statistikament sinifikanti fil-ħxuna tal-widna fil-ġrieden ittrattati meta mqabbla mal-ġrieden tal-kontroll sabiex jiġu identifikati sustanzi irritanti fl-LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Madankollu, għalkemm jistgħu jseħħu żidiet statistikament sinifikanti meta l-ħxuna tal-widna tkun inqas minn 25 % dawn ma ġewx assoċjati b'mod speċifiku ma' irritazzjoni eċċessiva (67) (31) (69) (70) (71).

24. L-osservazzjonijiet kliniċi li ġejjin jistgħu jindikaw tossiċità sistemika (35) meta jintużaw bħala parti minn valutazzjoni integrata u għalhekk jistgħu jindikaw il-livell massimu tad-doża li għandha tintuża fl-LLNA: DA ewlenija: bidliet fil-funzjoni tas-sistema nervuża (eż. pil wieqaf, atassja, rogħda, u konvulżjonijiet); bidliet fl-imġiba (eż. aggressività, bidla fl-attività tal-indafa, bidla sinifikanti fil-livell ta' attività); bidliet fit-tendenzi respiratorji (jiġifieri bidliet fil-frekwenza u fl-intensità tan-nifs bħal dispneja, nifs maqtugħ, u ħsejjes mill-pulmun (rales)), u bidliet fil-konsum tal-ikel u tal-ilma. Barra minn hekk, sinjali ta' letarġija u/jew nuqqas ta' reazzjoni u kull sinjal kliniku ieħor ta' aktar minn uġigħ jew tbatija żgħira jew momentanja, jew tnaqqis ta' >5 % fil-piż tal-ġisem minn Jum 1 sa Jum 8 u mortalità, għandhom jiġu kkunsidrati fl-evalwazzjoni. Annimali moribondi jew annimali li juru sinjali ta' uġigħ jew dieqa severa għandhom jinqatlu b'mod uman (36).

Skeda sperimentali tal-istudju ewlieni

25. L-iskeda sperimentali tal-analiżi hija kif ġej:

- <u>*Jum 1:*</u>

  Identifika individwalment u ħu nota tal-piż ta' kull annimal u ta' kwalunkwe osservazzjoni klinika. Applika soluzzjoni milwiema ta' 1 % sodju lauril sulfat (SLS) fuq il-parti ta' wara ta' kull widna billi tuża pinzell imbill fis-soluzzjoni ta' SLS sabiex tkopri d-dorsum ta' kull widna b'erba' jew ħames pinzellati. Siegħa wara t-trattament bl-SLS, applika 25 µL tad-dilwizzjoni xierqa tas-sustanza tat-test, il-mezz waħdu, jew il-PC (simultanja jew reċenti, skont il-politika tal-laboratorju fl-ikkunsidrar tal-paragrafi 11-15), fuq in-naħa ta' wara ta' kull widna.

- <u>*Jiem 2, 3 u 7:*</u>

  Irrepeti l-proċedura ta' applikazzjoni ta' qabel it-trattament bis-sustanza milwiema ta' 1% SLS u tas-sustanza tat-test imwettqa f'Jum 1.

- <u>*Jiem 4, 5 u 6:*</u>

L-ebda trattament.

- *Jum 8:*

  Ħu nota tal-piż ta' kull annimal u ta' kwalunkwe osservazzjoni klinika. Bejn wieħed u ieħor 24 sa 30 siegħa wara l-bidu tal-applikazzjoni f'Jum 7, oqtol l-annimali b'mod uman. Aqta' barra n-nodi limfatiċi awrikulari li jkunu qed inixxu minn kull widna tal-ġurdien u pproċessa separatament f' soluzzjoni ta' ilma bil-melħ ibbaferjata bil-fosfat (PBS) għal kull annimal. Id-dettalji u d-dijagrammi tal-identifikazzjoni u d-dissezzjoni tan-noduli limfatiċi tinsab fir-referenza (22). Sabiex tkompli tissorvelja r-reazzjoni lokali tal-ġilda fl-istudju ewlieni, jistgħu jiġu inklużi parametri oħrajn bħall-għoti ta' punti għall-eritema fil-widna jew il-kejl tal-ħxuna tal-widna (miksuba kemm permezz ta' gejġ tal-ħxuna, kif ukoll permezz tad-determinazzjonijiet tal-piżijiet bl-immarkar tal-widna fl-awtopsja) fil-protokoll tal-istudju.

It-tħejjija tas-sospensjonijiet taċ-ċelloli

26. Minn kull ġurdien, titħejja sospensjoni ta' ċellola singola ta' ċelloli tan-nodi limfatiċi (LNC - lymph node cells) maqtugħin bilateralment billi n-nodi limfatiċi jitpoġġew mgħaffġin bejn żewġ slajds tal-ħġieġ u tiġi applikata pressjoni ħafifa sabiex in-nodi jitgħaffġu. Wara li jiġi kkonfermat li t-tessut infirex irqiq, irqiq, issepara ż-żewġ slajds minn ma' xulxin. Issospendi t-tessut fuq iż-żewġ slajds fil-PBS billi żżomm kull slajd f'angolu fuq id-dixx Petri u filwaqt li tlaħlaħ b'PBS waqt li fl-istess ħin tqaxxar it-tessut mill-islajd bi scraper taċ-ċelloli. Barra minn hekk, in-nodi limfatiċi f'annimali NC huma żgħar, għalhekk operazzjoni attenta hija importanti sabiex ikun evitat kwalunkwe effett artifiċjali fuq il-valuri SI. Għandu jintuża volum total ta' 1 mL PBS għat-tlaħliħ taż-żewġ slajds. Is-sospensjoni tal-LNC fid-dixx Petri għandha tiġi omoġenizzata kemmxejn bl-iscraper taċ-ċelloli. Imbagħad jinġabar alikwott ta' 20 µL tas-sospensjoni tal-LNC b'mikropipetta, filwaqt li wieħed joqgħod attent li ma jiħux il-membrana li hija viżibbli għall-għajn, u sussegwentament jitħallat ma' 1.98 mL tal-PBS biex jagħti kampjun ta' 2 mL. Imbagħad jitħejja t-tieni kampjun ta' 2 mL, billi tintuża l-istess proċedura sabiex jitħejjew żewġ kampjuni għal kull annimal.

Determinazzjoni tal-proliferazzjoni ċellolari (kejl tal-kontenut tal-ATP tal-limfoċiti)

27. Żidiet fil-kontenut ta' ATP fin-nodi limfatiċi jitkejlu bil-metodu luċiferin/luċiferażi li juża kit tal-kejl tal-ATP, li jkejjel il-bijoluminexxenza f'Unitajiet ta' Luminexxenza Relattiva (Relative Luminescence Units – RLU). Il-ħin tal-analiżi mill-ħin tal-qatla tal-annimal sal-kejl tal-kontenut ta' ATP għal kull annimal individwali għandu jinżamm uniformi, fi żmien bejn wieħed u ieħor 30 minuta minħabba li l-kontenut ta' ATP huwa meqjus li gradwalment jonqos mal-ħin wara l-qatla tal-annimal (12). B'hekk, is-serje ta' proċeduri mill-qtugħ tan-nodi limfatiċi awrikulari sal-kejl tal-ATP għandha titlesta fi żmien 20 minuta permezz tal-iskeda ta' żmien predeterminata li hija l-istess għal kull annimal. Il-luminexxenza tal-ATP għandha titkejjel f'kull kampjun ta' 2 mL sabiex jinġabar total ta' żewġ kejlijiet ta' ATP għal kull annimal. Il-luminexxenza tal-ATP medja tiġi mbagħad stabbilita u użata f'kalkoli sussegwenti (ara paragrafu 30).

OSSERVAZZJONIJIET

Osservazzjonijiet kliniċi

28. Kull ġurdien għandu jiġi osservat b'attenzjoni mill-inqas darba kuljum għal kwalunkwe sinjal kliniku, kemm ta' irritazzjoni lokali fil-post tal-applikazzjoni jew ta' tossiċità sistemika. L-osservazzjonijiet kollha jiġu rreġistrati b'mod sistematiku u jinżammu rekords għal kull ġurdien. Il-pjanijiet ta' sorveljanza għandhom jinkludu kriterji sabiex jiġu identifikati mill-ewwel dawk il-ġrieden li juru tossiċità sistemika, irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda, jew tmermir tal-ġilda għall-ewtanażja (36).

Piżijiet tal-ġisem

29. Kif iddikjarat fil-paragrafu 25, il-piżijiet tal-ġisem tal-annimali individwali għandhom jitkejlu fil-bidu tat-test u fil-qatla b'mod uman skedata.

KALKOLU TAR-RIŻULTATI

30. Ir-riżultati għal kull grupp ta' trattament huma espressi bħala l-SI medja. L-SI jinkiseb billi wieħed jiddividi l-RLU/ġurdien medju f'kull grupp tas-sustanza tat-test, u l-grupp tal-PC, bl-RLU/ġurdien medju għall-grupp tas-solvent/VC. L-SI medju għall-VCs imbagħad ikun wieħed.

31. Il-proċess tad-deċiżjoni jqis riżultat bħala pożittiv meta SI $\geq$ 1.8 (10). Madankollu, il-qawwa tar-relazzjoni tad-doża-reazzjoni, is-sinifikat statistiku u l-konsistenza tas-solvent/mezz u r-reazzjonijiet tal-PC jistgħu jintużaw ukoll sabiex wieħed jiddetermina jekk riżultat marġinali (jiġifieri valur SI bejn 1.8 u 2.5) jiġix iddikjarat pożittiv (2) (3) (37).

32. Għal rispons pożittiv marġinali bejn SI ta' 1.8 u 2.5, l-utenti jistgħu jkunu jridu jikkunsidraw informazzjoni addizzjonali bħar-relazzjoni doża-reazzjoni, evidenza ta' tossiċità sistemika jew irritazzjoni eċċessiva, u fejn xieraq, sinifikat statistiku flimkien ma' valuri SI sabiex jiġi kkonfermat li tali riżultati huma pożittivi (10). Għandhom jiġu kkunsidrati d-diversi karatteristiċi tas-sustanza tat-test, inkluż jekk għandhiex relazzjoni strutturali ma' sustanzi magħrufa li joħolqu sensititizzazzjoni fil-ġilda, jekk tikkawżax irritazzjoni eċċessiva fil-ġilda tal-ġurdien, u n-natura tar-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni osservata. Dawn u kunsiderazzjonijiet oħrajn huma diskussi fid-dettall f'parti oħra (4).

33. Il-ġbir ta' dejta fil-livell tal-ġurdien individwali jippermetti li ssir analiżi statistika għall-preżenza u l-grad ta' relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni fid-dejta. Kull valutazzjoni statistika tista' tinkludi valutazzjoni tar-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni kif ukoll tqabbil aġġustat kif xieraq tal-gruppi tat-test (eż. grupp iddożat f'pari kontra tqabbil ta' kontroll ta' solvent simultanju/VC simultanji). L-analiżijiet statistiċi jistgħu jinkludu, eż. regressjoni lineari jew it-test ta' William għall-valutazzjoni tat-tendenzi tad-doża u tar-reazzjoni, u t-test ta' Dunnett għal tqabbil tal-pari. Meta jagħżel metodu xieraq għall-analiżi statistika, ir-riċerkatur għandu jkun konxju mill-inugwaljanzi possibbli tad-differenzi u problemi oħrajn relatati li jistgħu jeħtieġu trasformazzjoni tad-dejta jew analiżi statistika mhux parametrika. Fi kwalunkwe każ, ir-riċerkatur jista' jeħtieġ li jagħmel kalkoli tal-SI u analiżijiet statistiċi bi jew mingħajr ċerti punti ta' dejta (li xi drabi jissejħu "anomaliji" (outliers)).

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

34. Id-dejta għandha tingħata fil-qosor f'għamla ta' tabella li turi l-valuri tal-RLU tal-annimal individwali, l-RLU medju tal-grupp/annimal, it-terminu ta' żball assoċjat tiegħu (eż.

SD, SEM), u l-SI medju għal kull grupp ta' doża meta mqabbel mas-solvent/grupp ta' kontroll tal-mezz simultanju.

Rapport tat-test

35. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanzi kimiċi tat-test u ta' kontroll:

- dejta tal-identifikazzjoni (eż. in-numru tal-CAS u tal-KE, jekk disponibbli; is-sors; il-purità; l-impuritajiet magħrufa; in-numru tal-lott);
- in-natura fiżika u l-karatteristiċi fiżikokimiċi (eż. pH, volatilità, stabbilità, solubilità);
- jekk taħlita, il-kompożizzjoni u l-perċentwali relattivi tal-komponenti;

Solvent/mezz:

- dejta tal-identifikazzjoni (purità; konċentrazzjoni, fejn xieraq; il-volum użat);
- raġuni għall-għażla tal-mezz;

Annimali tat-test:

- is-sors tal-ġrieden tas-CBA;
- l-istatus mikrobijoloġiku tal-annimali, meta jkun magħruf;
- l-għadd u l-età tal-annimali;
- is-sors tal-annimali, il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ, id-dieta, eċċ.;

Kondizzjonijiet tat-test:

- is-sors, in-numru tal-lott u assigurazzjoni tal-kwalità tal-manifattur/dejta ta' kontroll tal-kwalità għall-kit tal-ATP;
- dettalji dwar it-tħejjija u l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test;
- raġuni għall-għażla tad-doża (inklużi riżultati mit-test ta' qabel l-iskrinjar, jekk ikun sar);
- il-konċentrazzjonijiet tal-mezz u tas-sustanza tat-test użati, u l-ammont totali tas-sustanza tat-test applikat;
- dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma (inkluż it-tip/is-sors tad-dieta, is-sors tal-ilma);
- dettalji dwar l-iskedi tat-trattament u tat-teħid ta' kampjuni;
- metodi ta' kejl tat-tossiċità;
- kriterji li ntużaw sabiex l-istudji jiġu kkunsidrati pożittivi jew negattivi;
- dettalji dwar kwalunkwe devjazzjoni mill-protokoll u spjegazzjoni dwar kif id-devjazzjoni taffettwa d-disinn u r-riżultati tal-istudju;

Verifika tal-affidabilità:

- sommarju tar-riżultati tal-aħħar kontroll tal-affidabbiltà, inkluża informazzjoni dwar is-sustanza tat-test, il-konċentrazzjoni u l-mezz użati;
- PC simultanju u/jew storiku u dwar dejta negattiva simultanja (solvent/mezz) għal-laboratorju li qed jagħmel it-test;

- jekk ma kinitx inkluża PC simultanja, id-data u r-rapport tal-laboratorju għall-aktar PC perjodika reċenti u rapport li jagħti dettalji dwar id-dejta tal-PC storika għal-laboratorju li tiġġustifika l-bażi għaliex ma saritx PC simultanja;

Ir-riżultati:

- piżijiet individwali tal-ġrieden fil-bidu tad-dożar u mal-qatla skedata; kif ukoll it-terminu ta' żball medju u assoċjat (eż. SD, SEM) għal kull grupp ta' trattament.
- il-ħin tal-bidu u tas-sinjali ta' tossiċità, inkluża l-irritazzjoni tal-ġilda fil-post fejn ingħatat id-doża, jekk ikun hemm, għal kull annimal;
- ħin tat-tmiem tal-annimal u ħin tal-kejl ATP għal kull annimal;
- tabella tal-valuri RLU tal-ġurdien individwali u valuri SI għal kull grupp ta' trattament tad-doża;
- terminu ta' żball medju u assoċjat (eż. SD, SEM) għal RLU/ġurdien għal kull grupp tat-trattament u r-riżultati tal-analiżi ta' barra għal kull grupp ta' trattament;
- l-SI kkalkulat u kejl xieraq tal-varjabbiltà li jikkunsidra l-varjabbiltà bejn l-annimali kemm fis-sustanza tat-test kif ukoll fil-gruppi ta' kontroll;
- ir-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni;
- analiżijiet statistiċi, fejn xieraq;

Diskussjoni tar-riżultati:

- kumment qasir dwar ir-riżultati, l-analiżi tad-doża u r-reazzjoni, u analiżijiet statistiċi, fejn xieraq, b'konklużjoni dwar jekk is-sustanza tat-test għandhiex titqies li tikkawża s-sensitizzazzjoni tal-ġilda.

LETTERATURA

(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/LLNAPRPRept2009.pdf].

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.,* 58, 1-10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.,* 58, 11-26.

(14) OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. 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]

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Preċiżjoni: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri aċċettati ta' referenza. Hija miżura tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (38).

Sustanza ta' riferiment: Sustanza sensitizzanti jew mhux sensitizzanti użata bħala standard għat-tqabbil ma' sustanza tat-test. Is-sustanza ta' riferiment għandu jkollha l-karatteristiċi li ġejjin; (i) sors(i) konsistenti u affidabbli; (ii) similarità strutturali u funzjonali għall-klassi ta' sustanzi li jkunu qed jiġu ttestjati; (iii) karatteristiċi fiżikokimiċi magħrufa; (iv) dejta ta' appoġġ dwar effetti magħrufa, u (v) potenza magħrufa fil-firxa ta' rispons mixtieq.

Negattiv falz: Sustanza identifikata ħażin bħala negattiva jew mhux attiva b'metodu ta' ttestjar, meta fil-fatt hija pożittiva jew attiva.

Pożittiv falz: Sustanza identifikata ħażin bħala pożittiva jew attiva minn test, meta fil-fatt hija negattiva jew mhux attiva.

Periklu: Il-potenzjal għal effett avvers għas-saħħa jew għall-ambjent. L-effett avvers jidher biss jekk hemm esponiment ta' livell suffiċjenti.

Riproduċibbiltà bejn laboratorju u ieħor: Kejl ta' kemm il-laboratorji kwalifikati differenti, li jużaw l-istess protokoll u li jittestjaw l-istess sustanzi tat-test, jistgħu jipproduċu riżultati li huma simili b'mod kwalitattiv u kwantitattiv. Ir-riproduċibbiltà bejn laboratorju u ieħor hija determinata matul il-proċessi ta' qabel il-validazzjoni u tal-validazzjoni, u tindika kemm it-test jista' jiġi trasferit b'suċċess bejn laboratorji, u din tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà bejn laboratorji (38).

Riproduċibbiltà intralaboratorja: Determinazzjoni ta' kemm il-persuni kwalifikati fi ħdan l-istess laboratorju jista' jirnexxilhom jirreplikaw ir-riżultati billi jużaw protokoll speċifiku fi żminijiet differenti. Din tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà fi ħdan il-laboratorju (38).

Outlier: Outlier hija osservazzjoni li hija mmarkata differenti minn valuri oħrajn f'kampjun aleatorju minn popolazzjoni.

Assigurazzjoni tal-kwalità: Proċess ta' ġestjoni li permezz tiegħu huma vvalutati l-aderenza mal-istandards ta' ttestjar tal-laboratorji, ir-rekwiżiti u l-proċeduri ta' żamma tar-rekords u l-preċiżjoni tat-trasferiment tad-dejta minn individwi li huma indipendenti minn dawk li jwettqu l-ittestjar.

Affidabilità: Miżuri li bihom, metodu ta' ttestjar jista' jiġi riprodott maż-żmien, fost u bejn il-laboratorji stess, meta jwettqu l-istess protokoll. Din hija vvalutata billi tiġi kkalkolata r-riproduċibbiltà fi ħdan laboratorju u bejn laboratorju u ieħor (38).

Is-sensitizzazzjoni tal-ġilda: Proċess immunoloġiku li jitfaċċa meta individwu suxxettibbli jkun espost b'mod topiku għal allerġen kimiku ta' induzzjoni, li jipprovoka rispons immuni fil-ġilda li jista' jwassal għall-iżvilupp ta' sensitizzazzjoni mal-kuntatt.

Indiċi ta' Stimulazzjoni (SI): Valur ikkalkolat sabiex jivvaluta l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' sustanza tat-test li huwa l-proporzjon tal-proliferazzjoni fil-gruppi ttrattati għal dak fil-grupp ta' kontroll ta' mezz simultanju.

Sustanza tat-test (li ssir referenza għaliha wkoll bħala s-sustanza kimika tat-test): Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan it-TM.

B.51 Sensitizzazzjoni tal-Ġilda: Analiżi tan-Nodulu Limfatiku Lokali BrdU-ELISA

INTRODUZZJONI

1. Il-Linji gwida tal-OECD għall-Ittestjar tas-Sustanzi Kimiċi u l-Metodi ta' Ttestjar tal-UE bbażati fuqhom jiġu analizzati minn żmien għal żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku, ħtiġijiet regolatorji li jinbidlu, u kunsiderazzjonijiet dwar il-benessri tal-annimali. L-ewwel Metodu ta' Ttestjar (TM) (B.42) għad-determinazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda fil-ġurdien, l-Analiżi tan-Nodi tal-Limfa Lokali (Local Lymph Node Assay - LLNA; Linja gwida 429 tat-Test tal-OECD) ġie rivedut (1 u Kapitolu B.42 f'dan l-Anness). Id-dettalji tal-validazzjoni tal-LLNA u l-analiżi tax-xogħol assoċjat magħha ġew ippubblikati (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Fl-LLNA, tintuża timidina jew jojdu radjoisotopiku biex titkejjel il-proliferazzjoni tal-limfoċiti u għaldaqstant, l-analiżi għandha użu limitat fejn l-akkwiżizzjoni, l-użu jew l-eliminazzjoni tar-radjuattività huma problematiċi. L-LLNA: BrdU-ELISA [Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Analiżi Immunosorbenti Relatata ma' Enzima)] huwa modifika mhux radjuattiva għat-TM tal-LLNA, li tuża 5-bromo-2-deossiuridina (BrdU) mhux radjutikkettata (Chemical Abstracts Service [CAS] Nru 59-14-3) f'sistema ta' test ibbażata fuq ELISA biex titkejjel il-proliferazzjoni tal-limfoċiti. L-LLNA: BrdU-ELISA ġie vvalidat u rivedut u rakkomandat minn panil internazzjonali ta' analiżi minn pari xjentifika u indipendenti meqjus utli għall-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi sensitizzanti u mhux sensitizzanti, b'ċerti limitazzjonijiet (10) (11) (12). Dan it-TM huwa mfassal għall-valutazzjoni tal-potenzjal tas-sustanzi kimiċi li jikkawżaw sensitizzazzjoni tal-ġilda (sustanzi u taħlitiet) fl-annimali. Kapitolu B.6 ta' dan l-Anness u l-Linja Gwida 406 tat-Test OECD jużaw fniek tal-Indi, b'mod partikolari t-test ta' massimizzazzjoni tal-fniek tal-Indi u t-test Buehler (13). L-LLNA (Kapitolu B.42 ta' dan l-Anness; Linja Gwida 429 tat-Test OECD) u ż-żewġ modifikazzjonijiet mhux radjuattivi, LLNA: BrdU-ELISA (Kapitolu B.51 ta' dan l-Anness; Linja Gwida 442 B tat-Test OECD) u LLNA: DA (Kapitolu B.50 ta' dan l-Anness; Linja Gwida 442 A tat-Test OECD), kollha jipprovdu vantaġġ fuq it-testijiet tal-fniek tal-Indi f'B.6 u fil-Linja Gwida 406 tat-Test OECD 13) f'termini ta' tnaqqis u rfinar tal-użu tal-annimali.

2. B'mod simili għal-LLNA, l-LLNA: BrdU-ELISA tistudja l-fażi tal-induzzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda u tipprovdi dejta kwantitattiva xierqa għall-valutazzjoni tar-reazzjoni tad-doża. Barra minn hekk, abilità li jinkixfu sensitizzaturi tal-ġilda mingħajr il-ħtieġa li tintuża radjutikketta għad-DNA telimina l-potenzjal għal esponiment fuq il-post tax-xogħol għal kwistjonijiet ta' radjuattività u ta' rimi ta' skart. Min-naħa tiegħu, dan jista' jippermetti għall-użu miżjud ta' ġrieden għall-kxif ta' sensitizzaturi tal-ġilda, li jnaqqas ulterjorment l-użu tal-fniek tal-Indi għal testijiet għal potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tat-Test OECD) (13).

DEFINIZZJONIJIET

3. Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

4. L-LLNA: BrdU-ELISA huwa metodu tal-LLNA modifikat għall-identifikazzjoni tal-potenzjal ta' sustanzi kimiċi li huma sensitizzanti għall-ġilda, b'limitazzjonijiet speċifiċi. Din id-doża mhux neċessarjament timplika li f'kull każ, l-LLNA: BrdU-ELISA għandha tintuża minflok l-LLNA jew it-testijiet fuq il-fniek tal-Indi (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tat-test OECD) (13), iżda pjuttost li l-analiżi għandha l-istess mertu u tista' tintuża bħala alternattiva

li fiha r-riżultati pożittivi u negattivi ġeneralment ma jkunux jeħtieġu aktar konferma (10) (11). Il-laboratorju tal-ittestjar għandu jikkunsidra l-informazzjoni disponibbli kollha fuq is-sustanza tat-test qabel iwettaq l-istudju. Din l-informazzjoni għandha tinkludi l-identità u l-istruttura kimika tas-sustanza tat-test; il-karatteristiċi fiżikokimiċi tagħha; ir-riżultati ta' kwalunkwe test ta' tossiċità *in vitro* jew *in vivo* fuq is-sustanza tat-test; u dejta tossikoloġika dwar sustanzi kimiċi strutturalment relatati. Din l-informazzjoni għandha titqies sabiex wieħed jiddetermina jekk l-LLNA: BrdU-ELISA hijiex adattata għas-sustanza (minħabba n-nuqqas ta' kompatibbiltà ta' tipi limitati ta' sustanzi kimiċi mal-LLNA: BrdU-ELISA [ara paragrafu 5]) u sabiex tgħin fl-għażla tad-doża.

5. L-LLNA: BrdU-ELISA huwa metodu *in vivo* u, b'konsegwenza ta' dan, ma jeliminax l-użu tal-annimali fil-valutazzjoni ta' attività ta' sensitizzazzjoni ta' kuntatt allerġiku. Madankollu, għandu l-potenzjal li jnaqqas l-użu tal-annimali għal dan il-għan meta mqabbel mat-testijiet bil-fniek tal-Indi (B.6; Linja gwida 406 tal-OECD) (13). Barra minn hekk, l-LLNA: BrdU-ELISA joffri rfinar sostanzjali tal-mod kif jintużaw l-annimali għall-ittestjar ta' sensitizzazzjoni ta' kuntatt allerġiku, minħabba li b'differenza minn B.6. u mil-Linja Gwida 406 tat-Test OECD, l-LLNA: BrdU-ELISA ma jeħtieġx li r-reazzjonijiet ta' ipersensittività dermali indotti bi sfida jkunu enfasizzati. Barra minn hekk, l-LLNA: BrdU-ELISA ma jeħtieġx l-użu ta' aġġuvant, bħal fil-każ tat-test tal-massimizzazzjoni tal-fenek tal-Indi (Kapitolu B.6 ta' dan l-Anness,13). B'hekk, l-LLNA: BrdU-ELISA inaqqas id-dieqa tal-annimal. Minkejja l-vantaġġi tal-LLNA: BrdU-ELISA fuq B.6 u l-Linja Gwida 406 tat-Test OECD (13), hemm xi limitazzjonijiet li jistgħu jeħtieġu l-użu ta' B.6 u l-Linja Gwida 13 tat-Test OECD (eż. l-ittestjar ta' ċerti metalli, sejbiet pożittivi foloz b'ċerti irritanti tal-ġilda [bħal xi sustanzi tat-tip tensjoattivi] (6) (1, u l-Kapitolu B.42 f'dan l-Anness), solubilità tas-sustanza tat-test). Barra minn hekk, il-klassijiet ta' sustanzi kimiċi jew sustanzi li fihom gruppi funzjonali li ntwerew li jaġixxu bħala konfonditturi potenzjali (15) jistgħu jeħtieġu l-użu ta' testijiet fuq il-fniek tal-Indi (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tat-Test OECD (13)). Limitazzjonijiet li ġew identifikati għal-LLNA (1, u Kapitolu B.42 f'dan l-Anness) ġew rakkomandati sabiex japplikaw ukoll għal-LLNA: BrdU-ELISA (10). Minbarra dawn il-limitazzjonijiet identifikati, l-LLNA: BrdU-ELISA għandu jkun applikabbli għall-ittestjar ta' kwalunkwe sustanza kimika diment li ma jkunx hemm karatteristiċi assoċjati ma' dawn is-sustanzi kimiċi li jistgħu jinterferixxu mal-preċiżjoni tal-LLNA: BrdU-ELISA. Barra minn hekk, għandha tingħata kunsiderazzjoni għall-possibilità ta' riżulatati pożittivi tal-limitu meta jinkisbu valuri ta' Indiċi ta' Stimulazzjoni (SI) ta' bejn 1.6 u 1.9 (ara l-paragrafi 31-32). Dan huwa bbażat fuq il-bażi ta' dejta ta' validazzjoni ta' 43 sustanza li jużaw SI $\geq$ 1.6 (ara paragrafu 6) li għalihom, l-LLNA: BrdU-ELISA identifika b'mod korrett it-32 sensitizzatur tal-LLNA, iżda b'mod inkorrett identifika tnejn minn 11-il nonsensitizzatur tal-LLNA b'valuri tal-SI ta' bejn 1.6 u 1.9 (jiġifieri linja tal-limitu pożittiva) (10). Madankollu, minħabba li l-istess sett ta' dejta ntuża għall-issettjar tal-valuri SI u għall-kalkolu tal-karatteristiċi ta' tbassir tat-test, ir-riżultati ddikjarati jistgħu jkunu stima eċċessiva tal-karatteristiċi ta' tbassir reali.

PRINĊIPJI TA' DAN IL-METODU TA' TTESTJAR

6. Il-prinċipju bażiku wara l-LLNA: BrdU-ELISA huwa li s-sensitizzaturi jikkawżaw il-proliferazzjoni ta' limfoċiti fin-noduli tal-limfa li jsaffu s-sit tal-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Din il-proliferazzjoni hija proporzjonata mad-doża u mal-qawwa tal-allerġen applikat u tipprovdi mezz sempliċi ta' kif wieħed jikseb kejl kwantitattiv ta' sensitizzazzjoni. Il-proliferazzjoni titkejjel billi wieħed iqabbel il-proliferazzjoni medja f'kull grupp tat-test mal-proliferazzjoni medja fil-grupp ta' kontroll ittrattati bil-mezzi (VC). Il-proporzjon tal-proliferazzjoni medja f'kull grupp ittrattat ma' dak fil-grupp VC simultanju, imsejjaħ l-SI, jiġi

stabbilit, u għandu jkun ≥1.6 qabel ma tkun meħtieġa evalwazzjoni ulterjuri tas-sustanza tat-test bħala sensitizzatur potenzjali tal-ġilda. Il-proċeduri deskritti hawnhekk huma bbażati fuq l-użu tal-kejl tal-kontenut tal-BrdU biex jindika għadd miżjud ta' ċelloli proliferanti fin-noduli tal-limfa awrikolari li jsaffu. BrdU huwa analogu ta' timidina u jiġi inkorporat b'mod simili fid-DNA ta' ċelloli li jipproliferaw. L-inkorporazzjoni tal-BrdU titkejjel b'ELISA, li tuża antikorp speċifiku għall-BrdU li huwa ttikkettat ukoll b'perossidażi. Meta jiżdied is-substrat, il-perossidażi jirreaġġixxi mas-substrat biex jipproduċi prodott ikkulurit li jiġi kwantifikat b'assorbenza speċifika permezz ta' qarrej tal-plakka f'livell ta' microtitre.

DESKRIZZJONI TAL-ANALIŻI

Għażla tal-ispeċi tal-annimali

7. Il-ġurdien huwa l-ispeċi tal-għażla għal dan it-test. Studji ta' validazzjoni għal-BrdU-ELISA twettqu esklussivament bir-razza CBA/JN li għaldaqstant hija kkunsidrata r-razza ppreferuta (10) (12). Jintużaw ġrieden nisa adulti żgħar, li huma nulliparużi u mhumiex tqal. Fil-bidu tal-istudju, l-annimali għandu jkollhom bejn 8 ġimgħat u 12-il ġimgħa, u l-varjazzjoni fil-piż tal-annimali għandha tkun minima u ma taqbiżx l-20 % tal-piż medju. Inkella, jistgħu jintużaw razez oħrajn u ġrieden irġiel meta tkun iġġenerata biżżejjed dejta li turi li ma jeżistux differenzi sinifikanti speċifiċi għar-razez u/jew għas-sess fir-reazzjoni għal-LLNA: BrdU-ELISA.

Kundizzjonijiet ta' fejn jinżammu u x'jieklu

8. Il-ġrieden għandhom jinżammu fi gruppi (16), sakemm ma tingħatax loġika xjentifika adegwata għat-tqegħid tal-ġrieden f'gaġeġ individwali. It-temperatura tal-kamra tal-annimali sperimentali għandha tkun ta' 22 ± 3ºC. Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-inqas 30 % u preferibbilment ma taqbiżx is-70 %, għajr waqt it-tindif tal-kamra, il-mira għandha tkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, u s-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, jistgħu jintużaw id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb.

It-tħejjija tal-annimali

9. L-annimali għandhom jintgħażlu b'mod aleatorju, immarkati sabiex ikunu jistgħu jiġu identifikati individwalment (iżda mingħajr l-ebda forma ta' mmarkar fil-widnejn), u miżmuma fil-gaġeġ tagħhom għal mill-inqas ħamest ijiem qabel ma jibda d-dożar sabiex ikunu jistgħu jidraw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju. Qabel il-bidu tat-trattament, l-annimali kollha jiġu eżaaminati sabiex ikun żgurat li huma ma jkollhom l-ebda feriti osservabbli fuq il-ġilda.

It-tħejjija tas-soluzzjonijiet għad-dożar

10. Is-sustanzi kimiċi solidi għandhom jinħallu jew jiġu sospiżi f'solventi/mezzi u dilwiti, jekk ikun xieraq, qabel l-applikazzjoni fuq il-widna tal-ġrieden. Is-sustanzi kimiċi likwidi jistgħu jiġu applikati waħedhom jew dilwiti qabel id-dożar. Is-sustanzi kimiċi li ma jinħallux, bħal dawk li naraw ġeneralment fl-apparat mediku, għandhom ikunu soġġetti għal estrazzjoni eżaġerata f'solvent adattat sabiex jiżvelaw il-kostitwenti kollha li jistgħu jiġu estratti għall-ittestjar qabel jiġu applikati fuq il-widna tal-ġrieden. Is-sustanzi tat-test għandhom jitħejjew kuljum sakemm id-dejta dwar l-istabilità ma turix li jistgħu jinħażnu.

Il-verifika tal-affidabbiltà

11. Sustanzi kimiċi ta' kontroll pożittiv (PC) jintużaw sabiex tintwera prestazzjoni xierqa tal-analiżi billi jirreaġixxu b'sensittività adegwata u riproduċibbli bħala sustanza tat-test sensitizzanti li għaliha l-kobor tar-reazzjoni huwa kkaratterizzat sew. L-inklużjoni ta' PC simultanju hija rrakkomandata għaliex dan juri l-kompetenza tal-laboratorju biex iwettaq b'suċċess kull analiżi u tippermetti l-valutazzjoni u t-tqabbil tar-riproduċibbiltà fil-laboratorju u bejn il-laboratorji. Xi awtoritajiet regolatorji jeħtieġu wkoll PC għal kull studju u għaldaqstant, l-utenti huma mħeġġa jikkonsultaw mal-awtoritajiet rilevanti qabel iwettqu l-LLNA: BrdU-ELISA: Għalhekk, l-użu ta' rutina ta' PC simultanju huwa rrakkomandat sabiex tiġi evitata l-ħtieġa ta' aktar ittestjar fuq l-annimali sabiex jintlaħqu tali rekwiżiti li jistgħu jinħolqu mill-użu ta' PC perjodiku (ara l-paragrafu 12). Il-PC għandu jipproduċi rispons pożittiv tal-LLNA: BrdU-ELISA f'livell ta' esponiment li mistenni jagħti żieda fl-SI > 1.6 fuq il-grupp ta' kontroll negattiv (NC). Id-doża tal-PC għandha tintgħażel b'mod li ma tikkawżax irritazzjoni eċċessiva fil-ġilda jew tossiċità sistemika u l-induzzjoni hija riproduċibbli iżda mhux eċċessiva (jiġifieri SI > 14 ikun jitqies eċċessiv). PC ippreferuti huma 25 % eżil ċinnamaldeid (Numru tal-CAS 101-86-0) u 25 % ewġenol (numru tal-CAS 97-53-0) fl-aċetun:żejt taż-żebbuġa (4:1, v/v). Jista' jkun hemm ċirkostanzi fejn, minħabba ġustifikazzjoni adegwata, jistgħu jintużaw PCs oħrajn, li jissodisfaw il-kriterji ta' hawn fuq.

12. Filwaqt li l-inklużjoni ta' grupp ta' PC simultanju hija rrakkomandata, jista' jkun hemm sitwazzjonijiet fejn l-ittestjar perjodiku (jiġifieri f'intervalli ≤ 6 xhur) tal-PC jista' jkun adegwat għal-laboratorji li jagħmlu l-LLNA: BrdU-ELISA b'mod regolari (jiġifieri jagħmlu l-LLNA: BrdU-ELISA fi frekwenza ta' mhux inqas minn darba fix-xahar) u għandhom bażi tad-dejta ta' PC storika stabbilita li turi l-kapaċità tal-laboratorju biex jikseb riżultati riproduċibbli u eżatti b'PCs. Profiċjenza adegwata bl-LLNA: BrdU-ELISA tista' tintwera b'suċċess billi jiġu ġġenerati riżultati pożittivi konsistenti bil-PC mill-inqas f'10 testijiet indipendenti li jsiru f'perjodu ta' żmien raġonevoli (jiġifieri inqas minn sena waħda).

13. Grupp ta' PC simultanju għandu dejjem ikun inkluż meta jkun hemm bidla fil-proċedura tal-LLNA: BrdU-ELISA (eż. bidla fil-persunal imħarreġ, bidla fil-materjali tal-metodu tat-test u/jew fir-reaġenti, bidla fit-tagħmir tal-metodu tat-test, bidla fis-sors tal-annimali tat-test), u dawn il-bidliet għandhom jiġu ddokumentati fir-rapporti tal-laboratorju. Għandu jiġi kkunsidrat l-impatt ta' dawn il-bidliet fuq l-adegwatezza tal-bażi tad-dejta storika stabbilita qabel ma tiġi deċiża l-ħtieġa li tkun stabbilita bażi tad-dejta storika ġdida sabiex tiddokumenta l-konsistenza fir-riżultati tal-PC.

14. Ir-riċerkaturi għandhom ikunu konxji li d-deċiżjoni li jsir studju tal-PC fuq bażi perjodika minflok fl-istess ħin għandha konsegwenzi fuq l-adegwatezza u l-aċċettabbiltà tar-riżultati ta' studju negattivi ġġenerati mingħajr PC simultanju waqt l-intervall bejn kull studju tal-PC perjodiku. Pereżempju, jekk jinkiseb riżultat negattiv falz fl-istudju tal-PC perjodiku, ir-riżultati negattivi tas-sustanza tat-test miksuba fl-intervall bejn l-aħħar studju tal-PC perjodiku aċċettabbli u l-istudju tal-PC perjodiku mhux aċċettabbli jistgħu jkunu dubbjużi. L-implikazzjonijiet ta' dawn l-eżiti għandhom jiġu kkunsidrati b'attenzjoni meta jkun deċiż jekk għandhomx ikunu inklużi PCs simultanji jew li jsiru biss PCs perjodiċi. Għandu jiġi kkunsidrat ukoll l-użu ta' inqas annimali fil-grupp ta' PC simultanju meta dan ikun iġġustifikat xjentifikament u jekk il-laboratorju juri, fuq dejta storika speċifika għal-laboratorju, li jistgħu jintużaw inqas ġrieden (17).

15. Għalkemm il-PC għandu jiġi ttestjat fil-mezz li huwa magħruf li jqanqal reazzjoni konsistenti (eż. aċetun: żejt taż-żebbuġa; 4:1, v/v), jista' jkun hemm ċerti sitwazzjonijiet regolatorji li fihom l-ittestjar f'mezz mhux standard (formulazzjoni rilevanti

klinikament/kimikament) ikun meħtieġ ukoll (18). Jekk il-PC simultanju jiġi ttestjat f'mezz differenti mis-sustanza tat-test, allura għandu jiġi inkluż VC separat għall-PC simultanja.

16. F'każijiet fejn ikunu qegħdin jiġu vvalutati sustanzi tat-test ta' klassi speċifika ta' sustanzi kimiċi jew firxa ta' reazzjonijiet, is-sustanzi ta' referenza jistgħu jkunu utli wkoll sabiex juru li l-metodu ta' ttestjar qed jaħdem sew sabiex isib il-potenzjal tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' dawn it-tipi ta' sustanzi tat-test. Is-sustanzi ta' referenza adattati għandu jkollhom il-karatteristiċi li ġejjin:

- xebh strutturali u funzjonali mal-klassi ta' sustanzi tat-test li qegħdin jiġu ttestjati;
- karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufa;
- dejta ta' appoġġ mil-LLNA: BrdU-ELISA;
- dejta ta' appoġġ minn mudelli oħrajn ta' annimali u/jew mill-bnedmin.

IL-PROĊEDURA TAT-TEST

Għadd ta' annimali u livelli tad-doża

17. Għal kull grupp ta' doża għandhom jintużaw tal-inqas erba' annimali, b'minimu ta' tliet konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test, flimkien ma' grupp ta' NC simultanju ttrattat biss bil-mezz għas-sustanza tat-test, u grupp ta' PC (simultanju jew reċenti, ibbażat fuq il-politika tal-laboratorju fl-ikkunsidrar tal-paragrafi 11-15). Għandu jiġi kkunsidrat l-ittestjar ta' dożi multipli tal-PC, b'mod speċjali meta wieħed jittestja l-PC fuq bażi intermittenti. Apparti fin-nuqqas ta' trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-gruppi ta' kontroll għandhom jiġu ġestiti u ttrattati b'mod identiku għall-annimali fil-gruppi tat-trattament.

18. L-għażla tad-doża u tal-mezz għandha tkun ibbażata fuq ir-rakkomandazzjonijiet mogħtija fir-referenzi 2 u 19. Dożi konsekuttivi normalment jintgħażlu minn sensiela xierqa ta' konċentrazzjonijiet bħal 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2.5 %, 1 %, 0.5 %, eċċ. Loġika xjentifika adegwata għandha takkumpanja l-għażla tas-sensiela ta' konċentrazzjonijiet użati. L-informazzjoni tossikoloġika kollha eżistenti (eż. tossiċità akuta u irritazzjoni fil-ġilda) u l-informazzjoni strutturali u fiżikokimika dwar is-sustanza tat-test ta' interess (u/jew sustanzi relatati strutturalment) għandhom jiġu kkunsidrati meta jkunu disponibbli, fl-għażla tat-tliet konċentrazzjonijiet konsekuttivi biex b'hekk l-ogħla konċentrazzjoni timmassimizza l-esponiment filwaqt li tevita t-tossiċità sistemika u/jew l-irritazzjoni lokali eċċessiva fil-ġilda (19)(20 u Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness). Fin-nuqqas ta' informazzjoni bħal din, jista' jkun meħtieġ test inizjali qabel l-iskrinjar (ara l-paragrafi 21-24).

19. Il-mezz ma għandux jinterferixxi ma' jew jinfluwenza r-riżultat tat-test u għandu jintgħażel fuq il-bażi tal-massimizzazzjoni tas-solubbiltà sabiex tinkiseb l-ogħla konċentrazzjoni li tista' tinkiseb filwaqt li tiġi prodotta soluzzjoni/sospensjoni adattata għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Il-mezzi rakkomandati huma aċetun: żejt taż-żebbuġa (4:1, v/v), *N,N*-dimetilformammid, metiletilketon, propilen glikol, u dimetilsulfossidu (6) iżda jistgħu jintużaw oħrajn jekk tingħata loġika xjentifika suffiċjenti. F'ċerti sitwazzjonijiet, jista' jkun meħtieġ li jsir użu minn solvent kimikament rilevanti jew mill-formulazzjoni kummerċjali li fiha s-sustanza tat-test hija kkummerċjalizzata bħala kontroll addizzjonali. Għandha tingħata attenzjoni partikolari sabiex ikun żgurat li s-sustanzi idrofiliċi tat-test ikunu inkorporati f'sistema ta' mezzi, li xxarrab il-ġilda u ma ċċarċarx mal-ewwel, permezz tal-

inkorporazzjoni ta' sustanzi li jħollu xierqa (eż. 1% Pluronic® L92). Għalhekk, mezzi għal kollox likwidi għandhom jiġu evitati.

20. L-ipproċessar ta' noduli tal-limfa minn ġrieden individwali jippermetti l-valutazzjoni tal-varjabbiltà bejn l-annimali u tqabbil statistiku tad-differenza bejn is-sustanza tat-test u l-kejl tal-grupp VC (ara paragrafu 33). Barra minn hekk, il-valutazzjoni tal-possibbiltà li jitnaqqas l-għadd ta' ġrieden fil-grupp PC hija fattibbli meta tinġabar dejta dwar annimali individwali (17). Barra minn hekk, ċerti awtoritajiet regolatorji jitolbu l-ġbir ta' dejta dwar annimali individwali. Ġbir regolari ta' dejta dwar annimali individwali jipprovdi vantaġġ mill-lat tal-benesseri tal-annimal billi jevita ttestjar doppju li jkun meħtieġ li kieku r-riżultati tas-sustanza tat-test li tkun inġabret oriġinarjament b'xi mod (eż. permezz ta' dejta miġbura dwar l-annimali) kellhom jiġu kkunsidrati aktar tard mill-awtoritajiet regolatorji ma' rekwiżiti oħrajn (eż. dejta individwali dwar l-annimali).

Test ta' qabel l-iskrinjar

21. Fin-nuqqas ta' informazzjoni sabiex tkun stabbilita l-ogħla doża li għandha tiġi ttestjata (ara paragrafu 18), għandu jsir test ta' qabel l-iskrinjar sabiex jiġi definit il-livell ta' doża xierqa li għandha tiġi ttestjata fl-LLNA: BrdU-ELISA. L-għan tat-test ta' qabel l-iskrinjar huwa li jipprovdi gwida għall-għażla tal-livell tad-doża massima għall-użu fl-istudju tal-LLNA:BrdU-ELISA prinċipali, fejn informazzjoni dwar il-konċentrazzjoni li twassal għal tossiċità sistemika (ara paragrafu 24) u/jew għal irritazzjoni eċċessiva lokali tal-ġilda (ara paragrafu 23) mhijiex disponibbli. Il-livell massimu tad-doża ttestjata għandu jkun konċentrazzjoni ta' 100 % tas-sustanza tat-test għal-likwidi jew il-konċentrazzjoni massima possibbli għas-solidi jew għas-sospensjonijiet.

22. It-test ta' qabel l-iskrinjar isir taħt l-istess kundizzjonijiet tal-istudju ewlieni tal-LLNA: BrdU-ELISA , ħlief għall-fatt li ma hemmx valutazzjoni tal-proliferazzjoni tan-noduli tal-limfa u li jistgħu jintużaw inqas annimali għal kull grupp ta' doża. Huwa ssuġġerit li jintuża annimal wieħed jew tnejn għal kull grupp ta' doża. Il-ġrieden kollha jiġu osservati kuljum għal kwalunkwe sinjal kliniku ta' tossiċità sistemika jew irritazzjoni lokali fis-sit tal-applikazzjoni. Il-piżijiet tal-ġisem jiġu ddokumentati qabel it-test u wara li jintemm (Jum 6). Iż-żewġ widniet ta' kull ġurdien jiġu osservati għall-eritema u jingħataw punteġġ skont it-Tabella 1 (20, u Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness). Jittieħed il-kejl tal-ħxuna tal-widna permezz ta' gejġ ta' ħxuna (eż. mikrometru diġitali jew gejġ tal-ħxuna Peacock Dial) fl-ewwel Jum (qabel id-doża), fit-tielet Jum (madwar 48 siegħa wara l-ewwel doża), u fis-sitt Jum. Barra minn hekk, fis-sitt Jum, il-ħxuna tal-widna tista' tiġi stabbilita permezz ta' determinazzjonijiet tal-piż bl-immarkar tal-widnejn, li għandu jsir wara li l-annimali jinqatlu b'mod uman. L-irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda hija indikata b'punteġġ ta' eritema ≥3 u/jew ħxuna tal-widna ta' ≥25 % fi kwalunkwe jum tal-kejl (21) (22). L-ogħla doża magħżula għall-istudju ewlieni tal-LLNA: BrdU-ELISA tkun id-doża l-aktar baxxa li jmiss fis-sensiela ta' konċentrazzjonijiet ta' qabel l-iskrinjar (ara paragrafu 18) li ma tikkawżax tossiċità sistemika u/jew irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda.

Tabella 1 Punteġġi għall-Eritema

Osservazzjoni	Punteġġ
L-ebda eritema	0
Ftit li xejn eritema (bil-kemm tidher)	1
Eritema definita sew	2
Eritema moderata sa severa	3
Eritema severa (ħmura qawwija) sa formazzjoni ta' tessut oħxon u danneġġat li jipprevjeni l-klassifikazzjoni tal-eritema	4

23. Minbarra żieda ta' 25 % fil-ħxuna tal-widna (21) (22), intużat ukoll żieda statistikament sinifikanti fil-ħxuna tal-widna fil-ġrieden ittrattati meta mqabbla mal-ġrieden tal-kontroll sabiex jiġu identifikati sustanzi irritanti fl-LLNA (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Madankollu, għalkemm jistgħu jseħħu żidiet statistikament sinifikanti meta l-ħxuna tal-widna tkun inqas minn 25% dawn ma ġewx assoċjati b'mod speċifiku ma' irritazzjoni eċċessiva (25) (26) (27) (28) (29).

24. L-osservazzjonijiet kliniċi li ġejjin jistgħu jindikaw tossiċità sistemika (30) meta jintużaw bħala parti minn valutazzjoni integrata u għalhekk jistgħu jindikaw il-livell massimu tad-doża li għandha tintuża fl-LLNA: BrdU-ELISA ewlenija: bidliet fil-funzjoni tas-sistema nervuża (eż. pil wieqaf, atassja, rogħda, u konvulżjonijiet); bidliet fl-imġiba (eż. aggressività, bidla fl-attività tal-indafa, bidla sinifikanti fil-livell ta' attività); bidliet fit-tendenzi respiratorji (jiġifieri bidliet fil-frekwenza u fl-intensità tan-nifs bħal dispneja, nifs maqtugħ, u ħsejjes mill-pulmun (rales), u bidliet fil-konsum tal-ikel u tal-ilma. Barra minn hekk, sinjali ta' letarġija u/jew nuqqas ta' reazzjoni u kull sinjal kliniku ieħor ta' aktar minn uġigħ jew tbatija żgħira jew momentanja, jew tnaqqis ta' >5 % fil-piż tal-ġisem minn Jum 1 sa Jum 6 u mortalità, għandhom jiġu kkunsidrati fl-evalwazzjoni. Annimali moribondi jew annimali li juru sinjali ta' uġigħ jew dieqa severa għandhom jinqatlu b'mod uman (31).

Skeda ta' sperimentazzjoni tal-istudju ewlieni

25. L-iskeda sperimentali tal-analiżi hija kif ġej:

- <u>*Jum 1:*</u>

  Identifika individwalment u ħu nota tal-piż ta' kull annimal u ta' kwalunkwe osservazzjoni klinika. Applika 25 µL tad-dilwizzjoni xierqa tas-sustanza tat-test, il-mezz waħdu, jew il-PC (simultanja jew reċenti, skont il-politika tal-laboratorju fl-ikkunsidrar tal-paragrafi 11-15), fuq in-naħa ta' wara ta' kull widna.

- <u>*Jiem 2 u 3:*</u>

  Irrepeti l-proċedura ta' applikazzjoni li għamilt f'Jum 1.

- <u>*Jum 4:*</u>

  L-ebda trattament.

- <u>*Jum 5:*</u>

Injetta 0.5 mL (5 mg/ġurdien) ta' soluzzjoni BrdU (10 mg/mL) ġewwa l-peritonju.

- *Jum 6:*

  Ħu nota tal-piż ta' kull annimal u ta' kwalunkwe osservazzjoni klinika. Madwar 24 siegħa (24h) wara l-injezzjoni tal-BrdU, oqtol l-annimali b'mod uman. Aqta' barra n-nodi limfatiċi awrikulari li jkunu qed inixxu minn kull widna tal-ġurdien u pproċessa separatament f'ilma bil-melħ ibbaferjat bil-fosfat (PBS) għal kull annimal. Id-dettalji u d-dijagrammi tal-identifikazzjoni u d-dissezzjoni tan-noduli limfatiċi tinsab fir-referenza (17). Sabiex tkompli tissorvelja r-reazzjoni lokali tal-ġilda fl-istudju ewlieni, jistgħu jiġu inklużi parametri oħrajn bħall-għoti ta' punti għall-eritema fil-widna jew il-kejl tal-ħxuna tal-widna (miksuba kemm permezz ta' gejġ tal-ħxuna, kif ukoll permezz tad-determinazzjonijiet tal-piżijiet bl-immarkar tal-widna fl-awtopsja) fil-protokoll tal-istudju.

It-tħejjija tas-sospensjonijiet taċ-ċelloli

26. Minn kull ġurdien, titħejja sospensjoni ta' ċellola waħdanija ta' ċelloli tan-nodi limfatiċi (LNC - lymph node cells) maqtugħin bilateralment b'diżaggregazzjoni mekkanika ħafifa permezz ta' xibka tal-istainless steel b'malja ta' 200 micron jew permezz ta' teknika aċċettabbli oħra għall-ġenerazzjoni ta' sospensjoni ta' ċellola waħda (eż. użu ta' pestle tal-plastik li tintrema wara l-użu sabiex jitfarrku n-nodi limfatiċi segwit minn mogħdija minn malja tan-najlon ta' #70). Il-proċedura għat-tħejjija tas-sospensjoni LNC hija kritika f'din l-analiżi u għaldaqstant, kull operatur għandu jistabbilixxi l-ħila bil-quddiem. Barra minn hekk, in-nodi limfatiċi f'annimali NC huma żgħar, għalhekk operazzjoni attenta hija importanti sabiex ikun evitat kwalunkwe effett artifiċjali fuq il-valuri SI. F'kull każ, il-volum fil-mira tas-sospensjoni LNC għandu jiġi aġġustat sa volum ottimizzat determinat (bejn wieħed u ieħor 15 mL). Il-volum ottimizzat huwa bbażat fuq l-ilħiq ta' assorbenza medja tal-grupp NC fi ħdan 0.1- 0.2.

Determinazzjoni tal-proliferazzjoni ċellolari (kejl tal-kontenut tal-BrdU fid-DNA ta' limfoċiti)

27. Il-BrdU titkejjel b'ELISA permezz ta' kit kummerċjali (*eż.* Roche Applied Science, Mannheim, Ġermanja, Numru tal-Katalgu 11 647 229 001). Fil-qosor, 100 µL tas-sospensjoni tal-LNC tiżdied mal-bjar ta' mikroplatt b'qiegħ ċatt fi triplikat. Wara fissazzjoni u denaturazzjoni tal-LNC, l-antikorp kontra l-BrdU jiżdied ma' kull bir u jitħalla jirreaġġixxi. Sussegwentement, l-antikorp kontra l-BrdU jitneħħa bil-ħasil u mbagħad, is-soluzzjoni tas-substrat tiżdied u titħalla tipproduċi kromoġen. Imbagħad titkejjel l-assorbenza ta' 370 nm b'wavelength ta' referenza ta' 492 nm. Fil-każijiet kollha, il-kundizzjonijiet tat-test tal-analiżi għandhom jiġu ottimizzati (ara paragrafu 26).

OSSERVAZZJONIJIET

Osservazzjonijiet kliniċi

28. Kull ġurdien għandu jiġi osservat b'attenzjoni mill-inqas darba kuljum għal kwalunkwe sinjal kliniku, kemm ta' irritazzjoni lokali fil-post tal-applikazzjoni jew ta' tossiċità sistemika. L-osservazzjonijiet kollha jiġu rreġistrati b'mod sistematiku u jinżammu rekords għal kull ġurdien. Il-pjani ta' sorveljanza għandhom jinkludu kriterji sabiex jiġu identifikati mill-ewwel dawk il-ġrieden li juru tossiċità sistemika, irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda, jew tmermir tal-ġilda għall-ewtanażja (31).

Piżijiet tal-ġisem

29. Kif iddikjarat fil-paragrafu 25, il-piżijiet tal-ġisem tal-annimali individwali għandhom jitkejlu fil-bidu tat-test u fil-qatla b'mod uman skedata.

KALKOLU TAR-RIŻULTATI

30. Ir-riżultati għal kull grupp ta' trattament huma espressi bħala l-SI medja. L-SI jinkiseb billi wieħed jiddividi l-indiċi medju ta' ttikkettar tal-BrdU/ġurdien f'kull grupp tas-sustanza tat-test u l-grupp tal-PC, bl-indiċi medju ta' ttikkettar tal-BrdU għall-grupp tas-solvent/VC. L-SI medju għall-VCs imbagħad ikun wieħed.

<u>L-indiċi tat-tikkettar tal-BrdU huwa definit bħala:</u>

$$\text{Indiċi tat-tikkettar tal-BrdU} = (ABS_{em} - ABS\ vojt_{em}) - (ABS_{ref} - ABS\ vojt_{ref})$$

Fejn; em = wavelength tal-emissjoni; u ref = wavelength ta' referenza.

31. Il-proċess tad-deċiżjoni jqis riżultat bħala pożittiv meta SI $\geq$ 1.6 (10). Madankollu, il-qawwa tar-relazzjoni tad-doża-reazzjoni, is-sinifikat statistiku u l-konsistenza tas-solvent/mezz u r-reazzjonijiet tal-PC jistgħu jintużaw ukoll sabiex wieħed jiddetermina jekk riżultat marġinali (jiġifieri valur SI bejn 1.6 u 1.9) jiġix iddikjarat pożittiv (3) (6) (32).

32. Għal rispons pożittiv marġinali bejn SI ta' 1.6 u 1.9, l-utenti jistgħu jkunu jridu jikkunsidraw informazzjoni addizzjonali bħar-relazzjoni doża-reazzjoni, evidenza ta' tossiċità sistemika jew irritazzjoni eċċessiva, u fejn xieraq, sinifikat statistiku flimkien ma' valuri SI sabiex jiġi kkonfermat li tali riżultati huma pożittivi (10). Għandhom jiġu kkunsidrati d-diversi karatteristiċi tas-sustanza tat-test, inkluż jekk għandhiex relazzjoni strutturali ma' sustanzi magħrufa li joħolqu sensititizzazzjoni fil-ġilda, jekk tikkawżax irritazzjoni eċċessiva fil-ġilda tal-ġurdien, u n-natura tad-doża-reazzjoni osservata. Dawn u kunsiderazzjonijiet oħrajn huma diskussi fid-dettall x'imkien ieħor f'dan id-dokument (4).

33. Il-ġbir ta' dejta fil-livell tal-ġurdien individwali jippermetti li ssir analiżi statistika għall-preżenza u l-grad ta' relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni fid-dejta. Kull valutazzjoni statistika tista' tinkludi valutazzjoni tar-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni kif ukoll tqabbil aġġustat kif xieraq tal-gruppi tat-test (eż. grupp iddożat f'pari kontra tqabbil ta' kontroll ta' solvent simultanju/VC simultanji). L-analiżijiet statistiċi jistgħu jinkludu, eż. regressjoni lineari jew it-test ta' William għall-valutazzjoni tat-tendenzi tad-doża u tar-reazzjoni, u t-test ta' Dunnett għal tqabbil tal-pari. Meta jagħżel metodu xieraq għall-analiżi statistika, ir-riċerkatur għandu jkun konxju mill-inugwaljanzi possibbli tad-differenzi u problemi oħrajn relatati li jistgħu jeħtieġu trasformazzjoni tad-dejta jew analiżi statistika mhux parametrika. Fi kwalunkwe każ, ir-riċerkatur jista' jeħtieġ li jagħmel kalkoli tal-SI u analiżijiet statistiċi b'ċerti punti ta' dejta jew mingħajrhom (li xi drabi jissejħu "anomaliji" (outliers)).

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

34. Id-dejta għandha tingħata fil-qosor f'għamla ta' tabella li turi l-valuri tal-indiċi tat-tikkettar tal-BrdU tal-annimal individwali, l-indiċi tat-tikkettar tal-BrdU medju tal-grupp/annimal, it-terminu ta' żball assoċjat tiegħu (eż. SD, SEM), u l-SI medju għal kull grupp ta' doża meta mqabbel mas-solvent/grupp ta' kontroll tal-mezz simultanju.

Rapport tat-test

35. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanzi kimiċi tat-test u ta' kontroll:

- dejta tal-identifikazzjoni (eż. in-numru tal-CAS u tal-KE, jekk disponibbli; is-sors; il-purità; l-impuritajiet magħrufa; in-numru tal-lott);
- in-natura fiżika u l-karatteristiċi fiżikokimiċi (eż. pH, volatilità, stabbiltà, solubilità);
- jekk taħlita, il-kompożizzjoni u l-perċentwali relattivi tal-komponenti;

Solvent/mezz:

- dejta tal-identifikazzjoni (purità; konċentrazzjoni, fejn xieraq; il-volum użat);
- raġuni għall-għażla tal-mezz;

Annimali tat-test:

- is-sors tal-ġrieden tas-CBA;
- l-istatus mikrobijoloġiku tal-annimali, meta jkun magħruf;
- l-għadd u l-età tal-annimali;
- is-sors tal-annimali, il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ, id-dieta, eċċ.;

Kondizzjonijiet tat-test:

- is-sors, in-numru tal-lott u assigurazzjoni tal-kwalità tal-manifattur/dejta ta' kontroll tal-kwalità (sensittività tal-antikorp u speċifiċità u l-limitu ta' kxif) għall-kit tal-ELISA;
- dettalji dwar it-tħejjija u l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test;
- raġuni għall-għażla tad-doża (inklużi riżultati mit-test ta' qabel l-iskrinjar, jekk ikun sar);
- il-konċentrazzjonijiet tal-mezz u tas-sustanza tat-test użati, u l-ammont totali tas-sustanza tat-test applikata;
- dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma (inkluż it-tip/is-sors tad-dieta, is-sors tal-ilma);
- dettalji dwar l-iskedi tat-trattament u tat-teħid ta' kampjuni;
- metodi ta' kejl tat-tossiċità;
- kriterji li ntużaw sabiex l-istudji jiġu kkunsidrati pożittivi jew negattivi;
- dettalji dwar kwalunkwe devjazzjoni mill-protokoll u spjegazzjoni dwar kif id-devjazzjoni taffettwa d-disinn u r-riżultati tal-istudju;

Verifika tal-affidabilità:

- sommarju tar-riżultati tal-aħħar kontroll tal-affidabbiltà, inkluża informazzjoni dwar is-sustanza tat-test, il-konċentrazzjoni u l-mezz użati;
- PC simultanju u/jew storiku u dwar dejta ta' kontroll negattiv simultanju (solvent/mezz) għal-laboratorju li qed jagħmel it-test;
- jekk ma kienx hemm inkluż PC simultanju, id-dejta u r-rapport tal-laboratorju għall-aktar PC perjodiku reċenti u rapport li jagħti dettalji dwar id-dejta storika tal-PC għal-laboratorju li tiġġustifika l-bażi għaliex ma sarx PC simultanju;

Ir-riżultati:

- piżijiet individwali tal-ġrieden fil-bidu tad-dożar u mal-qatla b'mod uman skedata; kif ukoll il-medja u t-terminu ta' żball assoċjat (eż. SD, SEM) għal kull grupp ta' trattament;
- il-ħin tal-bidu u tas-sinjali ta' tossiċità, inkluża l-irritazzjoni tal-ġilda fil-post fejn ingħatat id-doża, jekk ikun hemm, għal kull annimal;
- tabella tal-valuri tal-indiċi tat-tikkettar tal-BrdU u tal-valuri SI tal-ġurdien individwali għal kull grupp ta' trattament;
- terminu ta' żball medju u assoċjat (eż. SD, SEM) għal indiċi tat-tikkettar tal-BrdU/ġurdien għal kull grupp tat-trattament u r-riżultati tal-analiżi ta' barra għal kull grupp ta' trattament;
- l-SI kkalkulat u kejl xieraq tal-varjabbiltà li jikkunsidra l-varjabbiltà bejn l-annimali kemm fis-sustanza tat-test kif ukoll fil-gruppi ta' kontroll;
- ir-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni;
- analiżijiet statistiċi, fejn xieraq;

Diskussjoni tar-riżultati:

- kumment qasir dwar ir-riżultati, l-analiżi tad-doża u r-reazzjoni, u analiżijiet statistiċi, fejn xieraq, b'konklużjoni dwar jekk is-sustanza tat-test għandhiex titqies li tikkawża s-sensitizzazzjoni tal-ġilda.

LETTERATURA

(1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Linja Gwida tat-Test Nru 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq is-sit: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. u 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. u 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. u 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., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employement 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. Disponibbli fuq: [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 Nru 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibbli fuq is-sit: [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. Disponibbli fuq is-sit: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf]

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. u 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, Linja Gwida tat-Test Nru 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Parigi. Disponibbli fuq is-sit: [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. u 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. u 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. 7 edizzjoni. 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. Disponibbli fuq is-sit: [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, Linja Gwida tat-Test Nru 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Parigi. Disponibbli fuq is-sit: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. u 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. Disponibbli fuq is-sit: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. u 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. u 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. u 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. u 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. u 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. u Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721-728.

(29) Patterson, R.M., Noga, E. u 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. Disponibbli fuq is-sit: [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 Nru 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Parigi. Disponibbli fuq is-sit: [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., Hastings, K.L. (1998). An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ.l 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 Nru 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Parigi. Disponibbli fuq is-sit: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Preċiżjoni: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri aċċettati ta' referenza. Hija miżura tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (33).

Sustanza ta' riferiment: Sustanza sensitizzanti jew mhux sensitizzanti użata bħala standard għat-tqabbil ma' sustanza tat-test. Sustanza ta' riferiment għandu jkollha l-karatteristiċi li ġejjin: (i) konsistenti u affidabbli; (ii) similarità strutturali u funzjonali għall-klassi ta' sustanzi li jkunu qed jiġu ttestjati; (iii) karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufa; (iv) dejta ta' appoġġ dwar effetti magħrufa, u (v) potenza magħrufa fil-firxa ta' rispons mixtieq.

Negattiv falz: Sustanza tat-test identifikata ħażin bħala negattiv jew mhux attiva b'metodu ta' ttestjar, meta fil-fatt hija pożittiva jew attiva (33).

Pożittiv falz: Sustanza tat-test identifikata ħażin bħala pożittiva jew attiva minn test, meta fil-fatt hija negattiva jew mhux attiva (33).

Periklu: Il-potenzjal għal effett avvers għas-saħħa jew għall-ambjent. L-effett avvers jidher biss jekk hemm esponiment ta' livell suffiċjenti.

Riproduċibbiltà bejn laboratorju u ieħor: Kejl ta' kemm il-laboratorji kwalifikati differenti, li jużaw l-istess protokoll u li jittestjaw l-istess sustanza tat-test, jistgħu jipproduċu riżultati li huma simili b'mod kwalitattiv u kwantitattiv. Ir-riproduċibbiltà bejn laboratorju u ieħor hija determinata matul il-proċessi ta' qabel il-validazzjoni u tal-validazzjoni, u tindika kemm it-test jista' jiġi trasferit b'suċċess bejn laboratorji, u din tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà bejn laboratorji (33).

Riproduċibbiltà intralaboratorja: Determinazzjoni ta' kemm il-persuni kwalifikati fi ħdan l-istess laboratorju jista' jirnexxilhom jirrepplikaw ir-riżultati billi jużaw protokoll speċifiku fi żminijiet differenti. Din tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà fi ħdan il-laboratorju (33).

Outlier: Outlier hija osservazzjoni li hija mmarkata differenti minn valuri oħrajn f'kampjun aleatorju minn popolazzjoni.

Garanzija tal-kwalità: Proċess ta' ġestjoni li permezz tiegħu huma vvalutati l-aderenza mal-istandards ta' ttestjar tal-laboratorji, ir-rekwiżiti u l-proċeduri ta' żamma tar-rekords u l-preċiżjoni tat-trasferiment tad-dejta minn individwi li huma indipendenti minn dawk li jwettqu l-ittestjar.

Affidabilità: Miżuri li bihom, metodu ta' ttestjar jista' jiġi riprodott maż-żmien, fost u bejn il-laboratorji stess, meta jwettqu l-istess protokoll. Din hija vvalutata billi tiġi kkalkolata r-riproduċibbiltà fi ħdan laboratorju u bejn laboratorju u ieħor (33).

Is-sensitizzazzjoni tal-ġilda: Proċess immunoloġiku li jitfaċċa meta individwu suxxettibbli jkun espost b'mod topiku għal allerġen kimiku ta' induzzjoni, li jipprovoka reazzjoni immuni fil-ġilda li tista' twassal għall-iżvilupp ta' sensitizzazzjoni mal-kuntatt.

Indiċi ta' Stimolazzjoni (SI): Valur ikkalkolat sabiex jivvaluta l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' sustanza tat-test li huwa l-proporzjon tal-proliferazzjoni fil-gruppi ttrattati għal dak fil-grupp ta' kontroll ta' mezz simultanju.

Sustanza tat-test (li ssir referenza għaliha wkoll bħala s-sustanza kimika tat-test): Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan it-TM."