II

(Atti non legislativi)

REGOLAMENTI

REGOLAMENTO (UE) 2019/1390 DELLA COMMISSIONE

del 31 luglio 2019

recante modifica dell'allegato del regolamento (CE) n. 440/2008 che istituisce dei metodi di prova ai sensi del regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), al fine di adeguarlo al progresso tecnico

(Testo rilevante ai fini del SEE)

LA COMMISSIONE EUROPEA,

visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea,

visto il regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 18 dicembre 2006, concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'Agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la direttiva 1999/45/CE e che abroga il regolamento (CEE) n. 793/93 del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive della Commissione 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE [1], in particolare l'articolo 13, paragrafo 2,

considerando quanto segue:

(1) Il regolamento (CE) n. 440/2008 [2] della Commissione istituisce i metodi di prova per determinare le proprietà fisico-chimiche, la tossicità e l'ecotossicità delle sostanze chimiche applicabili ai fini del regolamento (CE) n. 1907/2006.

(2) L'Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico (OCSE) sviluppa linee guida armonizzate e riconosciute a livello internazionale per la sperimentazione sulle sostanze chimiche a fini regolamentari. L'OCSE pubblica periodicamente linee guida nuove e riviste per l'esecuzione delle prove, tenendo conto dei progressi scientifici in questo settore.

(3) Al fine di tener conto del progresso tecnico e, ove possibile, di ridurre il numero degli animali utilizzati a fini sperimentali, conformemente alle disposizioni dell'articolo 13, paragrafo 2, del regolamento (CE) n. 1907/2006, a seguito dell'adozione delle pertinenti linee guida dell'OCSE, dovrebbero essere introdotti due nuovi metodi di prova per la valutazione dell'ecotossicità e nove nuovi metodi di prova volti a determinare la tossicità per la salute umana, mentre sette metodi di prova dovrebbero essere aggiornati. Undici di tali metodi di prova consistono in prove *in vitro* intese a determinare l'irritazione/corrosione cutanea e oculare, la sensibilizzazione cutanea, la genotossicità e gli effetti sul sistema endocrino. I portatori di interessi sono stati consultati in merito alla presente proposta di modifica.

[1] GU L 396 del 30.12.2006, pag. 1.

[2] Regolamento (CE) n. 440/2008 della Commissione, del 30 maggio 2008, che istituisce dei metodi di prova ai sensi del regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH) (GU L 142 del 31.5.2008, pag. 1).

(4) Occorre pertanto modificare di conseguenza il regolamento (CE) n. 440/2008.

(5) Le misure di cui al presente regolamento sono conformi al parere del comitato istituito a norma dell'articolo 133 del regolamento (CE) n. 1907/2006,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

L'allegato del regolamento (CE) n. 440/2008 è modificato conformemente all'allegato del presente regolamento.

Articolo 2

Il presente regolamento entra in vigore il ventesimo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

Fatto a Bruxelles, il 31 luglio 2019

Per la Commissione
Il presidente
Jean-Claude JUNCKER

ALLEGATO

L'allegato del regolamento (CE) n. 440/2008 è così modificato:

1) nella parte B, il capitolo B.4 è sostituito dal seguente:

"B.4 **IRRITAZIONE/CORROSIONE CUTANEA ACUTA**

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 404 (2015). Le linee guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche sono rivedute periodicamente affinché riflettano le migliori conoscenze scientifiche disponibili. Nella revisione della linea guida dell'OCSE n. 404 è stata dedicata particolare attenzione ai miglioramenti possibili in relazione al benessere degli animali e alla valutazione di tutte le informazioni disponibili sulla sostanza chimica in esame, per evitare prove non necessarie sugli animali da laboratorio. La versione aggiornata della linea guida dell'OCSE n. 404 (originariamente adottata nel 1981 e riveduta nel 1992, nel 2002 e nel 2015) contiene un riferimento al documento di orientamento IATA (*Integrated Approaches to Testing and Assessment,* approcci integrati in materia di prove e valutazioni) per l'irritazione/corrosione cutanea (1), che propone un approccio modulare a tali prove. Oltre a descrivere vari moduli che raggruppano fonti d'informazioni e strumenti di analisi, il documento IATA i) fornisce orientamenti su come integrare e utilizzare i dati esistenti, sperimentali e non, a fini di valutazione del potenziale irritante e corrosivo delle sostanze chimiche a livello cutaneo, e ii) propone un approccio per i casi in cui sono necessarie prove aggiuntive (1). Nella prova iniziale *in vivo* la linea guida raccomanda inoltre, ove opportuno, di applicare all'animale le tre compresse per la prova da contatto una dopo l'altra anziché simultaneamente.

2. Le definizioni di irritazione e corrosione cutanea figurano nell'appendice del presente metodo di prova.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

3. Nell'interesse sia dell'accuratezza scientifica sia del benessere degli animali, è opportuno non ricorrere alle prove *in vivo* finché tutti i dati pertinenti disponibili circa il potenziale di corrosività/irritazione cutanea della sostanza chimica in esame non siano stati valutati nell'ambito di un'analisi basata sul "peso dell'evidenza", descritta nel documento di orientamento IATA per la corrosione e l'irritazione cutanea (vale a dire secondo quanto illustrato nelle tre parti del documento e nei relativi moduli) (1). In sintesi, nella parte 1 si prendono in considerazione i dati esistenti, suddivisi in sette moduli riguardanti i dati umani, i dati *in vivo*, i dati *in vitro*, i dati sulle proprietà fisico-chimiche (ad esempio il pH, in particolare una forte acidità o una forte alcalinità) e i metodi non sperimentali. Nella parte 2 si esegue l'analisi basata sul peso dell'evidenza. Se non è conclusiva si procede alle prove supplementari di cui alla parte 3, dapprima con metodi *in vitro* e soltanto come ultima istanza facendo ricorso a prove *in vivo*. Tale analisi dovrebbe pertanto portare a ridurre la necessità di prove *in vivo* relative alla corrosione/irritazione cutanea causata dalle sostanze chimiche per le quali, in relazione a questi due endpoint, altri studi hanno già fornito evidenza sufficiente.

PRINCIPIO DELLA PROVA IN VIVO

4. La sostanza chimica in esame è applicata in un'unica dose sulla pelle dell'animale sperimentale; le zone di pelle non trattate servono da controllo. A intervalli specificati si osserva il grado di irritazione/corrosione, che viene annotato sulla base di una scala di valori; esso viene inoltre descritto in modo dettagliato per fornire una valutazione completa degli effetti. La durata dello studio deve essere sufficiente a valutare la reversibilità o irreversibilità degli effetti osservati.

5. Gli animali che, in qualsiasi fase della prova, manifestano segni prolungati di grave sofferenza e/o dolore vanno soppressi con metodi non cruenti e la sostanza chimica in esame va valutata di conseguenza. I criteri da seguire nel decidere la soppressione con metodi non cruenti di animali moribondi o molto sofferenti formano l'oggetto di uno specifico documento di orientamento (2).

PREPARAZIONE PER LA PROVA IN VIVO

Selezione della specie animale

6. L'animale sperimentale di elezione è il coniglio albino; vanno utilizzati giovani adulti sani. L'eventuale ricorso ad altre specie animali deve essere giustificato.

Preparazione degli animali

7. All'incirca 24 ore prima della prova occorre rasare il pelo nella zona dorsale del tronco degli animali evitando di scorticare la pelle. Usare solo animali la cui pelle è sana e intatta.

8. Alcuni ceppi di coniglio presentano zone di pelo denso che sono più evidenti in alcuni periodi dell'anno. Tali aree di crescita densa del pelo non vanno usate ai fini della prova.

Condizioni di stabulazione e alimentazione

9. Gli animali vanno posti in gabbie individuali. La temperatura del locale deve essere di 20 °C (± 3 °C) per i conigli. L'umidità relativa deve essere preferibilmente del 50-60 %; in ogni caso deve raggiungere almeno il 30 % e possibilmente non superare il 70 %, tranne durante la pulizia degli ambienti. L'illuminazione deve essere artificiale, alternando 12 ore di luce e 12 ore di buio. Per l'alimentazione, i conigli saranno sottoposti a una dieta convenzionale da laboratorio e disporranno di acqua potabile a volontà.

PROCEDURA SPERIMENTALE

Applicazione della sostanza chimica in esame

10. La sostanza chimica in esame va applicata su una zona ridotta (circa 6 cm^2) di pelle e coperta con una compressa di garza fissata con un cerotto non irritante. Nei casi in cui non è possibile l'applicazione diretta (ad es. liquidi o alcune paste), la sostanza chimica in esame va prima applicata sulla compressa di garza, che poi è a sua volta applicata sulla pelle. La compressa va mantenuta in contatto lasco con la pelle mediante un'apposita fasciatura semiocclusiva per tutto il periodo di esposizione. Se la sostanza chimica in esame è applicata sulla compressa, quest'ultima va posizionata in modo che detta sostanza entri correttamente a contatto con la pelle e sia distribuita uniformemente. Occorre impedire che l'animale abbia accesso alla compressa e ingerisca o inali la sostanza chimica in esame.

11. Le sostanze chimiche liquide sono generalmente testate allo stato non diluito. Per l'esame dei solidi (che possono essere ridotti in polvere, se ritenuto necessario) la sostanza chimica in esame va inumidita con la minor quantità d'acqua (o, se del caso, di un altro mezzo disperdente adeguato) sufficiente ad assicurare un buon contatto con la pelle. Se si impiegano mezzi disperdenti diversi dall'acqua, la potenziale influenza del mezzo disperdente sull'irritazione cutanea causata dalla sostanza chimica in esame deve essere minima o nulla.

12. Al termine del periodo di esposizione, che è normalmente di quattro ore, la sostanza chimica in esame residua va rimossa usando, ove possibile, acqua o un solvente adeguato, senza alterare la risposta da essa provocata o l'integrità dell'epidermide.

Livelli di dose

13. Sul punto prescelto per la prova va applicata una dose di 0,5 ml di liquido o 0,5 g di solido o pasta.

Prova iniziale (prova di irritazione/corrosione cutanea in vivo su un solo animale)

14. Se la sostanza chimica in esame è stata giudicata corrosiva, irritante o non classificata sulla base di un'analisi basata sul peso dell'evidenza o di precedenti prove *in vitro*, ulteriori prove *in vivo* sono generalmente superflue. Tuttavia, nei casi in cui si ritiene necessario ottenere dati aggiuntivi, la prova *in vivo* viene eseguita inizialmente usando un solo animale e applicando il metodo seguente: applicare in sequenza all'animale al massimo tre compresse per la prova da contatto. Togliere la prima compressa dopo tre minuti. Se non si osservano reazioni cutanee gravi, applicare una seconda compressa in un punto differente e rimuoverla dopo un'ora. Se le osservazioni in questa fase indicano che è possibile prolungare l'esposizione fino a quattro ore senza causare sofferenze, applicare una terza compressa, che è rimossa dopo quattro ore, e classificare la reazione.

15. Se dopo una qualsiasi delle tre esposizioni in sequenza si osserva un effetto corrosivo, interrompere immediatamente la prova. Se dopo la rimozione dell'ultima compressa non si osserva alcun effetto corrosivo, mantenere l'animale sotto osservazione per quattordici giorni, a meno che la corrosione non si manifesti prima.

16. Qualora si preveda che la sostanza chimica in esame possa risultare irritante, ma non che produca corrosione, applicare un'unica compressa a un solo animale per quattro ore.

Prova confirmatoria (prova di irritazione cutanea in vivo su ulteriori animali)

17. Se nella prova iniziale non si osservano effetti corrosivi, confermare la reazione irritante o negativa su altri due animali al massimo, applicando a ciascuno una compressa per un periodo di esposizione di quattro ore. Se nella prova iniziale si osserva un effetto irritante, la prova confirmatoria può essere condotta in maniera sequenziale, oppure mediante esposizione simultanea di due ulteriori animali. Nel caso eccezionale in cui non sia stata eseguita la prova iniziale, due o tre animali possono essere trattati applicando una sola compressa, che va rimossa dopo quattro ore. Se si usano due animali ed entrambi evidenziano la stessa reazione, non sono necessarie ulteriori prove. In caso contrario si sottopone alla prova anche il terzo animale. È possibile che siano necessari altri animali per valutare le reazioni dubbie.

Periodo di osservazione

18. La durata del periodo di osservazione deve essere sufficiente a valutare completamente la reversibilità degli effetti osservati. Occorre tuttavia interrompere l'esperimento se, in qualsiasi momento, l'animale mostra segni continui di grave dolore o sofferenza. Per determinare la reversibilità degli effetti gli animali vanno osservati per 14 giorni dopo la rimozione delle compresse. Se la reversibilità si manifesta prima del quattordicesimo giorno, interrompere subito l'esperimento.

Osservazioni cliniche e classificazione delle reazioni cutanee

19. Esaminare tutti gli animali per verificare se presentano segni di eritema o di edema e classificare le reazioni a 60 minuti e successivamente a 24, 48 e 72 ore dalla rimozione della compressa. Per la prova iniziale su un solo animale, esaminare la zona prescelta per la prova subito dopo la rimozione della compressa. Le reazioni cutanee sono classificate e registrate in base ai gradi indicati nella tabella riportata più avanti. Se la pelle presenta una lesione che non può essere identificata come irritazione o corrosione a 72 ore, può essere necessario proseguire l'osservazione fino al giorno 14 per determinare la reversibilità degli effetti. In aggiunta all'osservazione delle irritazioni, descrivere e documentare tutti gli effetti tossici locali, come la perdita del grasso cutaneo, ed eventuali effetti sistemici negativi (ad es. effetti sui segni clinici di tossicità e sul peso corporeo). Per chiarire le reazioni dubbie, valutare l'opportunità di eseguire un esame istopatologico.

20. La classificazione delle reazioni cutanee è necessariamente soggettiva. Per favorirne l'armonizzazione e per assistere i laboratori e le persone che eseguono la prova e interpretano le osservazioni, istruire adeguatamente il personale sul sistema di punteggio usato (cfr. tabella più avanti). Potrebbe essere utile una guida illustrata per la classificazione dell'irritazione cutanea e di altre lesioni (3).

DATI E RELAZIONE

21. I risultati dello studio vanno riassunti sotto forma di tabella nella relazione finale sulla prova e devono comprendere tutti gli elementi elencati al paragrafo 24.

Valutazione dei risultati

22. Valutare il grado di irritazione cutanea congiuntamente alla natura e alla gravità delle lesioni, nonché alla loro reversibilità o irreversibilità. I punteggi individuali non forniscono un valore assoluto delle proprietà irritanti di un materiale, in quanto vanno valutatati anche altri effetti del materiale in esame. Per contro, essi devono essere considerati come valori di riferimento che vanno valutati congiuntamente a tutte le altre osservazioni emerse dallo studio.

23. Nella valutazione delle reazioni irritanti è necessario considerare la reversibilità delle lesioni cutanee. Quando reazioni quali alopecia (zona limitata), ipercheratosi, iperplasia e desquamazione persistono fino alla fine del periodo di osservazione di 14 giorni, la sostanza chimica in esame va considerata irritante.

Relazione sull'esecuzione della prova

24. La relazione sull'esecuzione della prova deve comprendere le informazioni elencate di seguito.

Giustificazione della prova in vivo:

— Analisi basata sul peso dell'evidenza dei risultati ottenuti da prove precedenti, compresi i risultati della strategia di prova sequenziale;

— descrizione dei dati pertinenti disponibili da prove precedenti;

— dati ricavati in ciascuna fase della strategia di prova;

— descrizione delle prove *in vitro* eseguite, inclusi i dettagli delle procedure e i risultati ottenuti per le sostanze in esame/di riferimento;

— analisi basata sul peso dell'evidenza per l'esecuzione dello studio *in vivo*.

Sostanza chimica in esame:

— sostanza monocostituente: identificazione della sostanza chimica, ad esempio mediante denominazione IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula strutturale, identità chimica delle impurità (se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono), ecc.;

— sostanza multicostituente, miscela e sostanze di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali biologici (UVCB): caratterizzati per quanto possibile mediante l'identità chimica (cfr. sopra), la presenza quantitativa e le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti;

— aspetto fisico, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche pertinenti;

— fonte, numero del lotto se disponibile;

— trattamento della sostanza chimica in esame/sostanza di controllo prima della prova, se del caso (ad es. riscaldamento, frantumazione);

— stabilità della sostanza chimica in esame, data limite di utilizzo o data della nuova analisi, se nota;

— condizioni di conservazione.

Mezzo disperdente:

— identificazione, concentrazione (ove pertinente), volume usato;

— motivazione della scelta del mezzo disperdente.

Animale/i sperimentale/i:

— specie/ceppo usato, motivazione dell'uso di animali diversi dal coniglio albino;

— numero di animali di ciascun sesso;

— peso di ciascun animale all'inizio e alla conclusione della prova;

— età all'inizio dello studio;

— origine degli animali, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.

Condizioni sperimentali:

— tecnica di preparazione dell'area di applicazione della compressa;

— dettagli relativi ai materiali utilizzati e alla tecnica di preparazione e di applicazione della compressa;

— dettagli relativi a preparazione, applicazione e rimozione della sostanza chimica in esame.

Risultati:

— tabella con i punteggi assegnati alle reazioni irritanti/corrosive per ciascun animale in tutti i momenti di misurazione;

— descrizione di tutte le lesioni osservate;

— descrizione circostanziata della natura e del grado dell'irritazione o della corrosione osservata e di eventuali reperti istopatologici;

— descrizione di altri effetti negativi locali (ad es. perdita del grasso cutaneo) e sistemici oltre all'irritazione o alla corrosione cutanea.

Discussione dei risultati

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998.

(3) 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 Publications, Series on Testing and Assessment (No 19), Organistion for Economic Cooperation and Development, Paris.

Tabella

Classificazione Delle Reazioni Cutanee

Eritema e formazione di escara

Nessun eritema	0
Eritema molto lieve (appena percettibile)	1
Eritema ben definito	2
Eritema da moderato a grave	3
Eritema grave (rosso vivo) fino alla formazione di escara che impedisce la classificazione dell'eritema	4

Massimo possibile: 4

Formazione di edema

Nessun edema	0
Edema molto lieve (appena percettibile)	1
Edema lieve (bordi dell'area ben definiti da gonfiore visibile)	2
Edema moderato (rigonfiamento di circa 1 mm)	3
Edema grave (rigonfiamento di oltre 1 mm ed esteso oltre la zona di esposizione)	4

Massimo possibile: 4

Per chiarire le reazioni dubbie è possibile eseguire un esame istopatologico.

APPENDICE

DEFINIZIONI

Sostanza chimica: una sostanza o miscela.

Irritazione cutanea: il manifestarsi di lesioni reversibili della pelle a seguito dell'applicazione della sostanza chimica in esame per non più di quattro ore.

Corrosione cutanea: il manifestarsi di lesioni irreversibili della pelle, segnatamente necrosi visibile dell'epidermide e del derma, a seguito dell'applicazione della sostanza chimica in esame per non più di quattro ore. Effetti tipici della corrosione sono ulcere, emorragie, escare sanguinanti e, al termine del periodo di osservazione di quattordici giorni, alterazione del colore dovuta a pallore della cute, zone di completa alopecia e cicatrici. Per valutare le lesioni dubbie, considerare l'opportunità di eseguire un esame istopatologico.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata seguendo il presente metodo di prova."

2) Nella parte B, il capitolo B.17 è sostituito dal seguente:

"B.17 **PROVA *IN VITRO* DI MUTAZIONE GENICA SU CELLULE DI MAMMIFERO NEI GENI HPRT E XPRT**

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 476 (2016). I metodi di prova vengono periodicamente rivisti alla luce dei progressi scientifici, delle mutevoli esigenze in materia di regolamentazione, e di considerazioni relative al benessere degli animali. L'attuale versione rivista del metodo di prova B.17 riflette quasi 30 anni di esperienza con questo metodo nonché i risultati dello sviluppo di un nuovo metodo distinto destinato alle prove *in vitro* di mutazione genica su cellule di mammifero utilizzando il gene timidina chinasi. Il metodo di prova B.17 è parte integrante di una serie di metodi di prova sulla tossicologia genetica. Un documento contenente informazioni succinte sulle prove di tossicologia genetica dell'OCSE, comprensivo di un compendio delle modifiche recentemente apportate alla rispettiva linea guida è stato elaborato dall'OCSE (1)

2. Scopo della prova *in vitro* di mutazione genica su cellule di mammifero è identificare mutazioni geniche indotte da sostanze chimiche. Le linee cellulari utilizzate in queste prove misurano le mutazioni "in avanti" dei geni reporter, in particolare il gene endogeno dell'ipoxantina-guanina fosfori-bosil transferasi (Hprt nelle cellule di roditori, HPRT nelle cellule umane; denominati collettivamente gene Hprt e prova HPRT in questo metodo di prova) e il transgene della xantina-guanina fosforibosil trasferasi (gpt) (denominato prova XPRT). Le prove di mutazione HPRT e XPRT individuano diversi spettri di fenomeni genetici. Oltre agli eventi mutazionali individuati dalla prova HPRT (ad es. sostituzioni di coppie di basi, mutazioni della cornice di lettura, piccole delezioni e inserzioni), la posizione autosomica del transgene gpt può permettere di individuare mutazioni prodotte da ampie delezioni ed eventualmente una ricombinazione mitotica non individuata dalla prova HPRT poiché il gene Hprt è situato nel cromosoma X (2) (3) (4) (5) (6) (7). Attualmente la prova XPRT è usata meno diffusamente della prova HPRT a fini regolamentari.

3. Le definizioni usate sono riportate nell'appendice 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

4. Le prove *in vitro* richiedono in generale l'uso di una fonte esogena di attivazione metabolica, ma il sistema esogeno di attivazione metabolica non simula perfettamente le condizioni *in vivo*.

5. Occorre adoperarsi per evitare condizioni che porterebbero a falsi risultati positivi (vale a dire potenziali interazioni con il sistema di prova), non causati da un'interazione diretta fra le sostanze chimiche in esame e il materiale genetico della cellula; tali condizioni includono modifiche del pH o dell'osmolalità (8) (9) (10), un'interazione con i componenti del terreno di coltura (11) (12) o una eccessiva citotossicità (13). Per la prova HPRT è considerata eccessiva una citotossicità che superi i massimi livelli di citotossicità raccomandati definiti al paragrafo 19.

6. Prima di applicare il presente metodo di prova a una miscela per generare dati ai fini regolamentari previsti, si deve considerare se, e in caso affermativo, perché, esso possa fornire risultati adeguati a tale scopo. Tale verifica non è necessaria se la miscela viene sottoposta a prova in ottemperanza a un obbligo regolamentare.

PRINCIPIO DELLA PROVA

7. Le cellule mutanti deficienti di attività dell'enzima Hprt nella prova HPRT o di attività dell'enzima xprt nella prova XPRT sono resistenti agli effetti citostatici dell'analogo della purina 6-tioguanina (TG). Le cellule hprt (nella prova HPRT) o gpt (nella prova XPRT) proficienti sono sensibili alla TG, che provoca l'inibizione del metabolismo cellulare e arresta la divisione cellulare. Di conseguenza, le cellule mutanti sono in grado di proliferare in presenza di TG, mentre le cellule normali, che contengono Hprt (nella prova HPRT) o gpt (nella prova XPRT), non lo sono.

8. Le cellule in sospensione o in colture monostrato sono esposte alla sostanza in esame, con e senza fonte esogena di attivazione metabolica (cfr. il paragrafo 14), per un tempo adeguato (3-6 ore), poi si allestiscono subculture per determinare la citotossicità e permettere l'espressione fenotipica prima della selezione dei mutanti (14) (15) (16) (17). La citotossicità è determinata dal tasso di sopravvivenza relativa (RS), ossia l'efficienza di clonazione misurata subito dopo il trattamento e adeguata per le eventuali perdite di cellule durante il trattamento rispetto al controllo negativo (paragrafo 18 e appendice 2). Le colture trattate sono mantenute nel terreno di coltura per un periodo sufficiente, specifico per ciascun tipo cellulare, per permettere l'espressione fenotipica ottimale delle mutazioni indotte (di solito minimo 7-9 giorni). Secondo l'espressione fenotipica, la frequenza dei mutanti è determinata mediante inseminazione di un numero noto di cellule in terreno contenente l'agente selettivo, per rilevare le colonie mutanti, e in terreno non contenente l'agente selettivo, per determinare l'efficacia di clonazione (vitalità). Dopo un adeguato periodo di incubazione le colonie sono contate. La frequenza dei mutanti è calcolata sulla base del numero di colonie di mutanti corretto per l'efficienza di clonazione al momento della selezione dei mutanti.

DESCRIZIONE DEL METODO

Preparazioni

Cellule

9. I tipi cellulari utilizzati per le prove HPRT e XPRT devono essere notoriamente sensibili ai mutageni chimici, presentare elevata efficienza di clonazione, cariotipo stabile e frequenza stabile delle mutazioni spontanee. Fra le cellule più comunemente usate per la prova HPRT si citano le linee CHO, CHL e V79 di cellule di criceto cinese, le cellule di linfoma di topo L5178Y e le cellule linfoblastoidi umane TK6 (18) (19). Per la prova XPRT si utilizzano cellule CHO AS52 contenenti il transgene gpt (con delezione del gene Hprt) (20) (21); la prova HPRT non può essere effettuata sulle cellule AS52 in quanto il gene hprt è stato soppresso. L'utilizzo di altre linee cellulari deve essere giustificato e validato.

10. Occorre controllare periodicamente la stabilità del numero modale dei cromosomi e l'assenza di contaminazione da micoplasma nelle linee cellulari (22) (23); non si devono usare cellule contaminate o che presentano modifiche del numero modale dei cromosomi. La durata normale del ciclo cellulare utilizzato nel laboratorio di prova deve essere stabilita e deve corrispondere alle caratteristiche cellulari pubblicate. Si deve anche controllare la frequenza dei mutanti spontanei nelle popolazioni di cellule madri che non devono essere utilizzate se la frequenza di mutanti non è accettabile.

11. Prima dell'utilizzo in questa prova le colture possono dover essere ripulite dalle cellule mutanti preesistenti, ad esempio mediante coltura in terreno di coltura HAT per la prova HPRT ed MPA per la prova XPRT (5) (24) (cfr. l'appendice 1). Le cellule pulite possono essere crioconservate e successivamente scongelate per essere utilizzate come stock di lavoro. Lo stock di lavoro appena scongelato può essere utilizzato per la prova previo raggiungimento dei normali tempi di raddoppiamento. Nell'effettuare la prova XPRT, la coltura di routine delle cellule AS52 avviene in condizioni che garantiscano il mantenimento del transgene gpt (20).

Terreni e condizioni di coltura

12. Le colture vanno mantenute in terreni di coltura e condizioni di incubazione (recipienti di coltura, atmosfera umidificata al 5 % di CO_2, temperatura di incubazione di 37 °C) adeguati. Le colture cellulari sono sempre mantenute in condizioni che garantiscano una crescita in fase esponenziale. È particolarmente importante che i terreni e le condizioni di coltura siano scelti in modo da garantire la crescita ottimale delle cellule durante il periodo di espressione e un'efficienza di clonazione ottimale delle cellule mutanti e non mutanti.

Preparazione delle colture

13. Le linee cellulari provengono da colture primarie, sono inseminate in un terreno di coltura ad una densità tale che le cellule in sospensione o in monostrato proseguiranno la loro crescita esponenziale durante le fasi di trattamento ed espressione (occorre ad esempio evitare la confluenza delle cellule che si stanno moltiplicando in monostrato).

Attivazione metabolica

14. Se si utilizzano cellule prive di un'adeguata capacità di attivazione metabolica endogena si deve ricorrere a sistemi di attivazione metabolica esogeni. Il sistema più comunemente usato, raccomandato in tutti i casi salvo alternativa motivata, è una frazione post-mitocondriale integrata di cofattore (S9), prelevata dal fegato di roditori (solitamente ratti) trattati con induttori enzimatici come Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) o con una combinazione di fenobarbitone e β-naftoflavone (29) (30) (31) (32). Quest'ultima combinazione è conforme alla Convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti (33), e ha dimostrato di essere altrettanto efficace dell'Aroclor 1254 nell'indurre ossidasi a funzione mista (29) (31). La frazione S9 viene di solito usata a concentrazioni comprese tra 1-2 % (v/v) ma può aumentare fino al 10 % (v/v) nel terreno di coltura finale. La scelta del tipo e della concentrazione del sistema di attivazione metabolica esogena o dell'induttore metabolico usato può dipendere dalla classe delle sostanze in esame (34) (35) (36).

Preparazione della sostanza chimica in esame

15. Le sostanze chimiche in esame solide devono essere preparate in adeguati solventi e, se necessario, diluite prima del trattamento delle cellule (cfr. il paragrafo 16). Le sostanze chimiche liquide in esame possono essere aggiunte direttamente alla coltura e/o diluite prima del trattamento del sistema di prova. Le sostanze chimiche in esame gassose o volatili devono essere sottoposte alla prova modificando adeguatamente i protocolli standard (trattamento in recipienti di coltura ermetici) (37) (38). Si usino preparati della sostanza chimica in esame approntati immediatamente prima del trattamento, salvo qualora siano disponibili dati sulla sua stabilità che dimostrino che la conservazione è accettabile.

CONDIZIONI DI PROVA

Solventi

16. La scelta del solvente deve favorire l'ottimizzazione della solubilità delle sostanze chimiche in esame, senza nuocere alla conduzione della sperimentazione (ad esempio influenzando la crescita cellulare), compromettere l'integrità della sostanza chimica in esame, reagire con recipienti di coltura o pregiudicare il sistema di attivazione metabolica. Si raccomanda di prendere in considerazione in primo luogo, se possibile, l'uso di un solvente acquoso (o terreno di coltura). Solventi di uso consolidato sono, ad esempio, l'acqua e il dimetilsolfossido. In generale è opportuno che i solventi organici non superino l'1 % (v/v) e quelli acquosi (soluzione fisiologica o acqua) il 10 % (v/v) nel terreno di trattamento finale. Se i solventi utilizzati sono poco noti (ad esempio, etanolo o acetone), il loro utilizzo è ammesso purché suffragato da dati che ne provino la compatibilità con la sostanza chimica in esame e con il sistema di prova nonché l'assenza di tossicità genetica alla concentrazione utilizzata. In assenza di tali dati, è importante aggiungere controlli non trattati (cfr. l'appendice 1) per dimostrare che il solvente scelto non induce effetti nocivi o mutageni.

Misurazione della citotossicità e scelta delle concentrazioni di esposizione

17. Nel determinare la concentrazione più elevata della sostanza chimica in esame, occorre evitare le concentrazioni che hanno la capacità di produrre falsi risultati positivi, come quelle che causano eccessiva citotossicità (cfr. il paragrafo 20), precipitazione nel terreno di coltura (cfr. il paragrafo 21) o variazioni marcate del pH od osmolalità (cfr. il paragrafo 5). Se la sostanza chimica in esame provoca un'alterazione marcata del pH del terreno al momento della sua aggiunta, è possibile adeguare il pH mediante l'azione tampone del terreno di trattamento finale in modo da evitare falsi risultati positivi e da mantenere condizioni di coltura appropriate.

18. La scelta della concentrazione si basa sulla citotossicità e su altre considerazioni (cfr. i paragrafi 20-22). Mentre la valutazione della citotossicità in una prova iniziale può essere utile per definire meglio le concentrazioni da utilizzare da utilizzare nell'esperimento principale, non è necessario condurre una prova iniziale. Anche se si effettua una valutazione iniziale della citotossicità, nella prova principale è ancora richiesta la misurazione della citotossicità di ciascuna coltura. La citotossicità va valutata per mezzo del tasso di sopravvivenza relativa, ossia l'efficienza di clonazione delle cellule piastrate subito dopo il trattamento, adeguata per le eventuali perdite di cellule durante il trattamento, in base alla conta cellulare, rispetto all'efficienza di clonazione adeguata nei controlli negativi (assegnata una sopravvivenza del 100 %) (cfr. l'appendice 2 per la formula).

19. Si usino almeno quattro concentrazioni di prova (senza contare i controlli positivi e i controlli con solvente) che soddisfano i criteri di accettabilità (citotossicità adeguata, numero di cellule, ecc.). Sebbene sia consigliabile l'utilizzo di colture doppie, per ciascuna concentrazione di prova si possono utilizzare colture replicate o uniche. I risultati ottenuti nelle colture replicate indipendenti con una determinata concentrazione devono essere riportati separatamente ma possono essere aggregati per l'analisi dei dati (17). Per le sostanze chimiche in esame la cui citotossicità è bassa o nulla, sono generalmente adeguati intervalli di concentrazione di un fattore di circa 2 a 3. In caso di citotossicità, le concentrazioni di prova selezionate dovrebbero rientrare in un intervallo di concentrazione a partire dai valori che producono citotossicità alle concentrazioni alle quali si riscontra una citotossicità modesta o nulla. Molte sostanze chimiche in esame presentano curve di concentrazione-risposta a forte pendenza e, per coprire l'intero intervallo di citotossicità o per valutare il rapporto concentrazione-risposta in dettaglio, può essere necessario utilizzare concentrazioni più ravvicinate e più di quattro concentrazioni, in particolare nei casi in cui è necessario ripetere l'esperimento (cfr. il paragrafo 43). L'utilizzo di più di quattro concentrazioni può essere particolarmente importante quando si utilizzano colture uniche.

20. Se la concentrazione massima è basata sulla citotossicità, la concentrazione più elevata dovrebbe mirare a realizzare un tasso RS compreso fra 20 e 10 %. Occorre cautela nell'interpretare risultati positivi reperiti con un tasso RS solo del 10 % o inferiore (paragrafo 43).

21. Per le sostanze chimiche in esame scarsamente solubili che non sono citotossiche a concentrazioni inferiori alla concentrazione insolubile più bassa, la concentrazione più elevata analizzata dovrebbe presentare una torbidità o un precipitato visibile ad occhio nudo o con un microscopio invertito alla fine del trattamento con la sostanza chimica in esame. Anche se la citotossicità si verifica a concentrazioni superiori a quella minima insolubile, è indicato effettuare la prova a una sola concentrazione che produce torbidità o un precipitato visibile, perché il precipitato può falsare gli effetti. Alla concentrazione che produce un precipitato, occorre assicurarsi che quest'ultimo non interferisca con la conduzione della sperimentazione. Può essere utile valutare la solubilità nel terreno di coltura prima della prova.

22. Se non si osserva nessun precipitato o nessuna citotossicità limitante, la concentrazione massima di prova dovrebbe essere pari al valore più basso fra 10 mM, 2 mg/ml o 2 µl/ml (39) (40). Quando la composizione della sostanza chimica in esame non è definita, ad esempio nel caso di sostanze di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali biologici (UVCB) (41), prodotti estratti dall'ambiente, ecc., può essere necessario aumentare la concentrazione massima (5 mg/ml) in assenza di citotossicità sufficiente, per aumentare la concentrazione di ciascun componente. Va tuttavia rilevato che tali requisiti possono essere diversi per i prodotti farmaceutici per uso umano (42).

Controlli

23. Per ciascuna condizione di prova si effettuano anche controlli negativi paralleli (cfr. il paragrafo 16), consistenti in solo solvente nel terreno di trattamento; i controlli vanno trattati come le colture di trattamento.

24. Controlli positivi paralleli sono necessari per dimostrare la capacità del laboratorio di individuare mutageni alle condizioni del protocollo di prova utilizzato e l'efficacia del sistema di attivazione metabolica esogeno, se del caso. Esempi di controlli positivi sono riportati nella tabella 1. Sostanze alternative possono essere usate per i controlli positivi, se necessario. Poiché le prove di genotossicità *in vitro* su cellule di mammifero sono sufficientemente standardizzate, le prove che utilizzano trattamenti con e senza attivazione metabolica esogena possono essere svolte solo con un controllo positivo che richiede l'attivazione metabolica. In tal caso, questa sola risposta in un controllo positivo dimostrerà sia l'attività del sistema di attivazione metabolica che la capacità di risposta del sistema di prova. Ciascun controllo positivo va utilizzato con una o più concentrazioni che generalmente danno luogo ad un aumento riproducibile e individuabile rispetto al valore di fondo per dimostrare la sensibilità del sistema sperimentale e la risposta non può essere compromessa da una citotossicità superiore ai limiti stabiliti nel presente metodo di prova (cfr. il paragrafo 20).

Tabella 1

Sostanze di riferimento raccomandate per la valutazione della competenza dei laboratori e per la selezione dei controlli positivi

Condizioni di attivazione metabolica	Locus	Sostanza e n. CAS
Assenza di attivazione metabolica esogena	*Hprt*	Metansolfonato di etile [n. CAS 62-50-0] Etilnitrosourea [n. CAS 759-73-9] 4–Nitrochinolina-1-ossido [n. CAS 56-57-5]
	xprt	Streptonigrina [n. CAS 3930-19-6] Mitomicina C [n. CAS 50-07-7]
Presenza di attivazione metabolica esogena	*Hprt*	3-Metilcolantrene [n. CAS 56-49-5] 7,12-Dimetilbenzantracene [n. CAS 57-97-6] Benzo(a)pirene [n. CAS 50-32-8]
	xprt	Benzo(a)pirene [n. CAS 50-32-8]

PROCEDURA

Trattamento con la sostanza chimica in esame

25. Le cellule in proliferazione sono trattate con la sostanza chimica in esame in presenza e in assenza di un sistema di attivazione metabolica. L'esposizione deve protrarsi per un periodo adeguato (si considerano di norma adeguate 3-6 ore).

26. Il numero minimo di cellule utilizzate per ciascuna coltura di prova (di controllo e trattate) in ogni fase della prova è basata sulla frequenza dei mutanti spontanei. Un orientamento generale è trattare e preparare subcolture di un numero sufficiente di cellule per mantenere 10 mutanti spontanei in ciascuna coltura in tutte le fasi della prova (17). La frequenza dei mutanti spontanei di norma è compresa fra 5 e 20 × 10-6. Per una frequenza di mutanti spontanei di 5 × 10-6 e per mantenere un numero sufficiente di mutanti spontanei (10 o più) anche per le colture trattate a concentrazioni che causano il 90 % di citotossicità durante il trattamento (RS 10 %), è necessario trattare almeno 20 × 106 cellule. Inoltre durante il periodo di espressione va coltivato e piastrato per la selezione dei mutanti un numero sufficiente di cellule (ma mai meno di 2 milioni) (17).

Tempo di espressione fenotipica e misurazione della frequenza dei mutanti

27. Dopo il periodo di trattamento le cellule sono coltivate per consentire l'espressione del fenotipo mutante. Di norma è sufficiente un minimo di 7-9 giorni per permettere l'espressione subottimale del fenotipo dei mutanti neoindotti Hprt e xprt (43) (44). Durante questo periodo le cellule sono sottoposte a sub-coltura regolarmente per mantenerle in crescita esponenziale. Dopo l'espressione fenotipica le cellule sono ripiastrate in terreno di coltura con e senza agenti selettivi (6-tioguanina) per determinare rispettivamente il numero dei mutanti e l'efficienza di clonazione al momento della selezione. Tale piastratura è effettuata per mezzo di piastre per colture monostrato o di piastre da microtitolazione per le cellule in sospensione. Per la selezione dei mutanti le cellule sono piastrate a una densità tale da garantire un recupero ottimale dei mutanti (ossia, evitare la cooperazione metabolica) (17). Le piastre sono incubate per un periodo opportuno per ottenere una crescita ottimale della colonia (ad esempio 7-12 giorni) e si contano le colonie. La frequenza dei mutanti è calcolata sulla base del numero di colonie di mutanti corretto per l'efficienza di clonazione al momento della selezione dei mutanti (cfr. l'appendice 2 per le formule).

Competenza del laboratorio

28. Al fine di acquisire una sufficiente esperienza con una prova prima di utilizzarla regolarmente, il laboratorio deve aver effettuato una serie di esperienze con sostanze di riferimento positive che agiscono mediante meccanismi differenti (almeno una con attivazione metabolica e una senza attivazione metabolica, con sostanze selezionate dalle sostanze chimiche elencate nella tabella 1) e con vari controlli negativi (con diversi solventi/mezzi disperdenti). Le risposte dei controlli positivi e negativi devono essere coerenti con la letteratura. Questo requisito non si applica ai laboratori con esperienza, ossia che dispongono di una base di dati storici quale definita ai paragrafi da 30 a 33.

29. Una selezione di sostanze chimiche utilizzate come sostanze di controllo positivo (cfr. il paragrafo 25, tabella 1) deve essere verificata in assenza e in presenza di attivazione metabolica, allo scopo di dimostrare che il laboratorio dispone della competenza necessaria per individuare le sostanze chimiche mutagene, determinare l'efficacia del sistema di attivazione metabolica e dimostrare l'adeguatezza delle condizioni di crescita delle cellule durante il trattamento, l'espressione fenotipica e la selezione dei mutanti nonché dei metodi di conteggio Occorrerà definire un intervallo di concentrazione delle sostanze selezionate che consenta di ottenere aumenti riproducibili e correlati alla concentrazione rispetto ai valori di fondo allo scopo di dimostrare la sensibilità e l'intervallo dinamico del sistema di prova.

Dati storici di controllo

30. Il laboratorio deve stabilire:

— un intervallo e una distribuzione dei controlli positivi storici;

— un intervallo e una distribuzione dei controlli negativi (non trattati, con solvente).

31. All'acquisizione dei primi dati di distribuzione dei controlli negativi storici, è necessario che i controlli negativi paralleli siano coerenti con i dati di controllo pubblicati (22). Successivamente, man mano che nuovi dati sperimentali ampliano la distribuzione dei controlli, i dati dei controlli negativi paralleli dovrebbero, idealmente, rientrare nei limiti di controllo al 95 % di tale distribuzione (17) (45) (46).

32. La banca dati dei controlli negativi storici del laboratorio deve inizialmente essere costituita con un minimo di 10 esperimenti ma preferibilmente con almeno 20 esperimenti svolti in condizioni sperimentali analoghe. I laboratori devono utilizzare metodi di controllo della qualità, quali diagrammi di controllo (ad esempio carte C o carte X medio (47)), per rilevare la variabilità dei loro dati di controllo positivi e negativi e dimostrare che la metodologia è "sotto controllo" nel laboratorio (46). Ulteriori raccomandazioni su come sviluppare e utilizzare i dati storici (cioè i criteri per l'inclusione e l'esclusione di dati nelle serie storiche e i criteri di accettabilità per un determinato esperimento) sono reperibili nella letteratura scientifica (45).

33. I dati dei controlli negativi consistono nelle frequenze di mutanti da un'unica coltura o preferibilmente da colture replicate, come descritto al paragrafo 23. I controlli negativi paralleli dovrebbero idealmente situarsi entro i limiti di tale controllo al 95 % della distribuzione della banca dati dei controlli negativi storici del laboratorio (17) (45) (46). Se i dati dei controlli negativi paralleli si situano al di fuori del limite di controllo al 95 %, la loro inclusione nella distribuzione dei controlli storici può essere accettata a condizione che tali dati non siano valori estremi e che sia provato che il sistema di prova è "sotto controllo" (cfr. *supra*) e che non vi sono stati problemi tecnici o errori umani.

34. Eventuali modifiche del protocollo sperimentale devono essere valutate in base alla coerenza con le banche dati storiche in relazione ai controlli. Eventuali notevoli incoerenze devono tradursi nella creazione di una nuova banca dati storica sui controlli.

DATI E RELAZIONE

Presentazione dei risultati

35. La presentazione dei risultati include tutti i dati necessari a calcolare la citotossicità (espressa come RS). I dati per le colture trattate e di controllo includono il numero di cellule alla fine del trattamento, il numero di cellule piastrate immediatamente dopo il trattamento e le conte delle colonie (o il numero di pozzetti senza colonie per il metodo della microtitolazione). Il tasso di RS per ciascuna coltura va espresso come percentuale relativa del concomitante controllo con solvente (cfr. l'appendice 1 per le definizioni).

36. La presentazione dei risultati include anche tutti i dati necessari a calcolare la frequenza dei mutanti. I dati per le colture trattate e di controllo includono: 1) il numero di cellule piastrate con e senza agenti selettivi (nel momento in cui le cellule sono piastrate per la selezione dei mutanti) e 2) il numero di colonie contate (o il numero di pozzetti senza colonie per il metodo della microtitolazione) nelle piastre con e senza agenti selettivi. La frequenza dei mutanti è calcolata sulla base del numero di colonie di mutanti (nelle piastre con agenti selettivi) corretto per l'efficienza di clonazione (dalle piastre senza agenti selettivi). La frequenza dei mutanti è espressa come numero di cellule mutanti per milione di cellule vitali (cfr. l'appendice 1 per le definizioni).

37. Devono essere forniti dati sulle singole colture. Tutti i dati vanno riportati sinteticamente in una tabella.

Criteri di accettabilità

38. L'accettazione dei risultati di una prova si basa sui criteri seguenti:

— il controllo negativo parallelo è considerato accettabile per inserimento nella banca dati sui controlli negativi storici di laboratorio come descritto al paragrafo 33.

— I controlli positivi paralleli (cfr. il paragrafo 24) devono indurre risposte compatibili con quelle generate nella banca dati dei controlli positivi storici e produrre un aumento statisticamente significativo rispetto al controllo negativo parallelo.

— Sono state testate due condizioni sperimentali (con e senza attivazione metabolica) a meno che una abbia portato a risultati positivi (cfr. il paragrafo 25).

— Un adeguato numero di cellule e concentrazioni è analizzabile (paragrafi 25, 26 e 19).

— I criteri di selezione della concentrazione massima sono conformi a quelli descritti ai paragrafi 20, 21 e 22.

Analisi e interpretazione dei risultati

39. A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è considerata chiaramente positiva se, in una qualsiasi delle condizioni sperimentali esaminate:

— almeno una delle concentrazioni di prova presenta un aumento statisticamente significativo rispetto al controllo negativo parallelo;

— un metodo adeguato di analisi della tendenza evidenzia che l'aumento è collegato alla concentrazione;

— uno o più risultati si situano al di fuori della distribuzione dei dati di controllo negativi storici (ad es. limite del controllo al 95 % in base alla distribuzione di Poisson, cfr. il paragrafo 33).

Se tutti i criteri sono soddisfatti, la sostanza chimica in esame è ritenuta in grado di indurre mutazioni genetiche in cellule di mammifero coltivate nel presente sistema di prova. Raccomandazioni dei metodi statistici più appropriati sono reperibili nella letteratura scientifica (46) (48).

40. A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è ritenuta chiaramente negativa se in tutte le condizioni sperimentali esaminate:

— nessuna delle concentrazioni sperimentali presenta un incremento statisticamente significativo rispetto al controllo negativo parallelo;

— un test di tendenza appropriato dimostra che non vi è aumento correlato alla concentrazione;

— tutti i risultati si situano entro la distribuzione dei dati di controllo negativi storici (ad es. limite del controllo al 95 % in base alla distribuzione di Poisson, cfr. il paragrafo 33).

La sostanza chimica in esame è quindi ritenuta non in grado di indurre mutazioni genetiche in cellule di mammifero coltivate nel sistema di prova.

41. Non è necessario verificare una risposta palesemente positiva o negativa.

42. Nei casi di risposta non chiaramente positiva o negativa come sopra descritto o per contribuire a stabilire la pertinenza biologica di un risultato, i dati devono essere valutati da esperti e/o mediante ulteriori indagini. Può essere utile ripetere un esperimento modificandone eventualmente le condizioni (ad esempio, intervallazione delle concentrazioni, altre condizioni di attivazione metabolica, ossia concentrazione S9 od origine S9).

43. In rari casi, anche dopo ulteriori analisi, la serie di dati non consente di valutare i risultati come positivi o negativi. Pertanto la risposta della sostanza chimica in esame va considerata equivoca (interpretata come altrettanto positiva o negativa).

Relazione sull'esecuzione della prova

44. I seguenti dati devono figurare nella relazione sull'esecuzione della prova.

Sostanza chimica in esame:

— origine, numero di lotto e data di scadenza, se disponibile;

— stabilità della sostanza chimica in esame, se nota.

— solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente, se note;

— misurazione del pH, dell'osmolalità e del precipitato nel terreno di coltura a cui è stata aggiunta la sostanza chimica in esame, se del caso.

Sostanza monocostituente:

— aspetto fisico, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche;

— identificazione chimica, come la denominazione IUPAC o CAS, il numero CAS, il codice SMILES o InChI, la formula strutturale, l'identità chimica o impurità, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc.

Sostanza multicostituente, UVCB e miscele:

— caratterizzata nella massima misura possibile con l'identità chimica (vedasi sopra), con la presenza quantitativa e con le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti.

Solvente:

— giustificazione della scelta del solvente;

— percentuale di solvente nel terreno di coltura finale.

Cellule

Per le colture madri di laboratorio:

— tipo, origine delle linee cellulari;

— numero di passaggi, se disponibile, e dati storici del laboratorio;

— caratteristiche del cariotipo e/o numero modale di cromosomi;

— metodi usati per la mantenimento delle colture cellulari;

— assenza di micoplasma;

— tempi di raddoppiamento delle cellule.

Condizioni sperimentali:

— criteri di selezione delle concentrazioni e del numero di colture: ad esempio i dati relativi alla citotossicità e ai limiti di solubilità;

— composizione dei terreni di coltura, concentrazione di CO_2, livello di umidità;

— concentrazione della sostanza chimica in esame espressa come concentrazione finale nel terreno di coltura (ad esempio µg o mg/ml o mM di terreno di coltura);

— concentrazione (e/o volume) del solvente e della sostanza chimica in esame aggiunti nel terreno di coltura;

— temperatura di incubazione;

— tempo di incubazione;

— durata del trattamento;

— densità delle cellule durante il trattamento;

— tipo e composizione del sistema di attivazione metabolica (fonte di S9, metodo di preparazione della miscela S9, concentrazione o volume della miscela S9 e di S9 nel terreno di coltura finale, controlli di qualità S9);

— sostanze di controllo positive e negative, concentrazioni finali per ciascuna condizione di trattamento;

— durata del periodo di espressione (con numero di cellule inseminate, sub-colture e protocolli di alimentazione, se del caso);

— identità e concentrazione dell'agente selettivo;

— criteri di accettabilità delle prove;

— metodi usati per contare il numero di cellule vitali e mutanti;

— metodi utilizzati per la misurazione della citotossicità;

— eventuali informazioni supplementari pertinenti per la citotossicità e metodo utilizzato;

— durata dei tempi di incubazione dopo la piastratura;

— criteri in base ai quali i risultati sono considerati positivi, negativi o equivoci;

— metodi utilizzati per determinare il pH, l'osmolalità e la precipitazione.

Risultati:

— numero di cellule trattate e numero di cellule sottoposte a sub-coltura per ciascuna coltura;

— misurazioni della citotossicità e altre osservazioni se del caso;

— segni di precipitazione e momento della determinazione;

— numero di cellule piastrate nel terreno di coltura selettivo e in quello non selettivo;

— numero di colonie nel terreno di coltura non selettivo e numero di colonie resistenti in quello selettivo e relative frequenze dei mutanti;

— relazione concentrazione-risposta, se possibile;

— dati sui controlli negativi (solvente) e positivi (concentrazioni e solventi) paralleli;

— dati sui controlli negativi (solvente) e positivi, con intervalli, medie e deviazioni standard nonché intervallo di confidenza (ad es. 95 %) e numero di dati;

— Analisi statistiche (per le colture singole e le repliche raggruppate se del caso), e gli eventuali valori-p.

Discussione dei risultati

Conclusione

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

(2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.

(3) Chu E.H.Y. and Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306-1312.

(4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. and Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagen. Res., 4, 394-403.

(5) Aaron C.S. and Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, 121-128.

(6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. and Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, 235-239.

(7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. and Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program.Mutation Res., 196, 17-36.

(8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. and Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-204.

(9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. and Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, 297-305.

(10) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, Environ. Mutagen., 8, 789-886.

(11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. and Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutation Res., 49, 439-452.

(12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. and Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634, 177-183.

(13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., and Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. Mutation Res., 5841-256.

(14) Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. and Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135-141.

(15) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9-17.

(16) Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. and Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133-147.

(17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. and Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., and Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, Mutation Res., 86, 193-214.

(19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, Mutation Res., 85, 165-175.

(20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., and Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2*gpt*-Transformed Cells, Mol. Cell. Biol., 4, 1411-1415.

(21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., and Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. Proc Natl Acad Sci., 83(24): 9616–9620.

(22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in preparation).

(23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. and Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, 33, 261-287.

(24) Rosen M.P., San R.H.C. and Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299-305.

(25) Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. and de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, 83-90.

(26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. and Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.

(27) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347-364.

(28) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173, 215.

(29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. and Wolf R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen. 7, 175-177.

(30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. and Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. and Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. and Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. Pathol. *Toxicol.*, 4, 55-65.

(32) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28, 51-59.

(33) UNEP. (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Available at: [http://www.pops.int.html].

(34) Tan E.-L. and Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cγ Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. Mutation Res., 84, 147-156.

(35) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. Environ. Mol. Mutation., 4, 7-18.

(36) Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. Environ. Mol. Mutation, 4, 7-18.

(37) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91-103.

(38) Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. and Brooks A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen.,5, 795-801.

(39) OECD (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). Available upon request from the Organisation for Economic Cooperation and Development.

(40) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, Environ. Mol. Mutation, 54, 36-43.

(41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances,

(42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Available at: [https://federalregister.gov/a/2012-13774].

(43) O'Neill J.P. and Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguranine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), Mutation, Res., 59, 109-118.

(44) Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., and Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. Mutation, Res., 1335(2):121-8.

(45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., and Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation,Res., 723, 87-90.

(46) OECD (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No 199), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., and Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(48) Fleiss J. L., Levin B., and Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Appendice 1

DEFINIZIONI

Mutageni che provocano la sostituzione di coppie di basi: sostanze che provocano la sostituzione di una o più coppie di basi del DNA.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Efficienza di clonazione: percentuale di cellule piastrate a bassa densità in grado di crescere in una colonia che può essere contata.

Concentrazioni: si riferiscono alle concentrazioni finali della sostanza chimica in esame nel terreno di coltura.

Citotossicità: per le prove di cui alla presente linea guida, la citotossicità corrisponde a una riduzione del tasso di sopravvivenza relativa delle cellule trattate rispetto al controllo negativo (cfr. il paragrafo specifico).

Mutazione "in avanti": una mutazione genica in cui dal tipo parentale alla forma mutante si ha alterazione o perdita dell'attività enzimatica o della funzione della proteina codificata.

Mutageni che provocano la mutazione della fase di lettura: sostanze chimiche che provocano l'inserzione o la delezione di una o più coppie di basi nella molecola di DNA.

Genotossico: termine generico che comprende tutti i tipi di danno a carico del DNA o dei cromosomi, tra cui rotture del DNA, cancellazioni, riarrangiamenti, mutazioni genetiche, aberrazioni cromosomiche e aneuploidia. Non tutti i tipi di effetti genotossici determinano alterazioni cromosomiche o danni permanenti ai cromosomi.

Terreno di coltura HAT: terreno di coltura contenente ipoxantina, aminopterina e timidina, utilizzato per ripulire dai mutanti Hprt.

Ricombinazione mitotica: durante la mitosi, ricombinazione fra cromatidi omologhi risultanti nell'eventuale induzione di rotture del doppio filamento del DNA o in una perdita di eterozigosi.

Terreno di coltura MPA: terreno di coltura contenente xantina, adenina, timidina, aminopterina e acido micofenolico, utilizzato per ripulire dai mutanti Xprt.

Mutageno: un fattore in grado di provocare mutazioni ereditarie delle sequenze di coppie di basi del DNA nei geni o della struttura dei cromosomi (aberrazioni cromosomiche).

Frequenza dei mutanti (MF): il numero di colonie mutanti osservato, diviso per il numero di cellule piastrate nel terreno di coltura selettivo, corretto per l'efficienza di clonazione (o vitalità) al momento della selezione.

Tempo di espressione fenotipica: il tempo trascorso dal trattamento durante il quale l'alterazione genetica si fissa nel genoma e tutti i prodotti genici preesistenti scompaiono fino all'alterazione del tratto fenotipico.

Tasso di sopravvivenza relativa (RS): è utilizzato come misura della citotossicità del trattamento. Il tasso di sopravvivenza relativa è dato dall'efficienza di clonazione delle cellule piastrate subito dopo il trattamento, adeguata per le eventuali perdite di cellule durante il trattamento, rispetto all'efficienza di clonazione nei controlli negativi (cui è assegnata una sopravvivenza del 100 %).

Frazioni S9 di fegato: supernatante dell'omogenato di fegato centrifugato a 9 000 g (estratto di fegato crudo).

Miscela di frazione S9: miscela di frazione S9 di fegato e dei cofattori necessari all'attività degli enzimi metabolici.

Controllo con solvente: termine generico che designa le colture di controllo che ricevono unicamente il solvente utilizzato per dissolvere la sostanza chimica in esame.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata applicando il presente metodo di prova.

Controllo non trattato: colture non sottoposte a trattamento (che non ricevono alcuna sostanza chimica in esame né solvente) ma preparate in parallelo e in modo identico alle culture esposte alla sostanza chimica in esame.

UVCB: sostanze di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali biologici.

Appendice 2

FORMULE PER LA VALUTAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ E DELLA FREQUENZA DEI MUTANTI

La citotossicità è valutata per mezzo del tasso di sopravvivenza relativa, ossia l'efficienza di clonazione delle cellule piastrate subito dopo il trattamento, rispetto all'efficienza di clonazione adeguata nei controlli negativi (cui è assegnata una sopravvivenza del 100 %) (cfr. formula RS, infra).

L'efficienza di clonazione adeguata per una coltura trattata con una sostanza chimica in esame è calcolata come:

$$\text{CE adattato} = \frac{\text{numero di cellule alla fine del trattamento}}{\text{numero di cellule all'inizio del trattamento}}$$

Il tasso di sopravvivenza relativa per una coltura trattata con una sostanza chimica in esame è calcolato come:

$$\text{RS} = \frac{\text{CE adattato nella coltura trattata}}{\text{CE adattato nel controllo con solvente}} \times 100$$

La frequenza dei mutanti è l'efficienza di clonazione delle colonie mutanti nel terreno di coltura (mezzo) selettivo diviso per l'efficienza di clonazione nel terreno di coltura non selettivo misurata per la stessa coltura al momento della selezione.

$$\text{Frequenza dei mutanti} = \frac{\text{efficienza di clonazione delle colonie mutanti nel mezzo selettivo}}{\text{efficienza di clonazione nel mezzo non selettivo}}$$

Se per l'efficienza di clonazione si utilizzano piastre:

CE = numero di colonie / numero di cellule piastrate.

Se per l'efficienza di clonazione si utilizzano piastre da microtitolazione:

Il numero di colonie per pozzetto su piastre da microtitolazione segue la distribuzione di Poisson.

Efficienza di clonazione = LnP(0) / numero di cellule piastrate per pozzetto.

Dove: LnP(0) è il numero probabile di pozzetti vuoti rispetto al numero di pozzetti inseminati ed è illustrata dalla formula seguente:

LnP(0) = Ln (numero di pozzetti vuoti / numero di pozzetti piastrati) 3) Nella parte B, il capitolo B.22 è sostituito dal seguente:"

3) capitolo B.22 è sostituito dal seguente:

"B.22 **SAGGIO DI LETALITÀ DOMINANTE NEI RODITORI**

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche (TG) 478 (2016). I metodi di prova vengono periodicamente rivisti alla luce dei progressi scientifici, delle mutevoli esigenze in materia di regolamentazione, e di considerazioni relative al benessere degli animali. La presente versione modificata del metodo di prova riflette oltre 30 anni di esperienza con questo metodo e il potenziale di integrarlo o combinarlo questo metodo con altre prove di tossicità, ad esempio gli studi volti a individuare la tossicità sullo sviluppo, sulla riproduzione o la genotossicità; tuttavia, a causa delle limitazioni e del ricorso a un ampio numero di animali, il presente metodo di prova non è destinato a essere usato come metodo principale, bensì piuttosto come metodo di prova supplementare cui ricorrere quando non vi sono alternative per soddisfare i requisiti regolamentari. La combinazione di diverse prove di tossicità permette potenzialmente di risparmiare un gran numero di animali su cui sono effettuate le prove di tossicità. È stato elaborato un documento OCSE contenente informazioni succinte sulle prove di tossicologia genetica e un compendio delle modifiche recentemente apportate alla rispettiva linea guida (1).

2. Scopo del metodo di prova sulla letalità dominante (DL) è esaminare se le sostanze chimiche causano mutazioni derivanti da aberrazioni cromosomiche nelle cellule germinali. Inoltre il metodo di prova di DL è rilevante per valutare la genotossicità. Difatti, benché possano variare a seconda delle specie, i fattori del metabolismo *in vivo*, gli aspetti farmacocinetici e i processi di riparazione del DNA sono attivi e contribuiscono alle risposte. L'induzione di una mutazione letale dominante per effetto dell'esposizione ad una sostanza chimica indica che la sostanza ha attaccato il tessuto germinale dell'animale sperimentale.

3. Le mutazioni letali dominanti provocano la morte dell'embrione o del feto. L'induzione di una mutazione da letali dominanti per effetto dell'esposizione ad una sostanza chimica indica che la sostanza ha attaccato le cellule germinali dell'animale sperimentale.

4. Un metodo di prova di DL è utile per confermare i risultati positivi delle prove utilizzando endpoint somatici *in vivo* e costituisce un indicatore pertinente per predire i rischi per gli esseri umani e i rischi di malattie genetiche trasmesse tramite la linea germinale. Tuttavia il presente metodo di prova richiede un ampio numero di animali ed è ad alta intensità di lavoro; di conseguenza la sua esecuzione risulta molto costosa e richiede molto tempo. Poiché la frequenza spontanea di mutazioni letali dominanti è alquanto elevata, la sensibilità del metodo per rilevare i modesti incrementi della frequenza delle mutazioni è generalmente limitata.

5. Le definizioni dei termini fondamentali figurano nell'appendice 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

6. In genere, la prova è effettuata sui topi (2) (3) (4) ma in alcuni casi, giustificati sotto il profilo scientifico, possono essere utilizzate altre specie, come i ratti (5) (6) (7) (8). Le mutazioni letali dominanti sono generalmente il risultato di gravi aberrazioni cromosomiche (strutturali e anomalie numeriche) (9) (10) (11), ma non si possono escludere mutazioni geniche. Una mutazione DL è una mutazione che avviene in una cellula germinale o dopo la fecondazione nell'embrione in fase iniziale dopo la fecondazione, non causa disfunzioni del gamete ma risulta letale per l'ovulo fecondato o per l'embrione in fase di sviluppo.

7. Ciascun maschio è accoppiato in sequenza con femmine vergini ad intervalli appropriati. Il numero di accoppiamenti successivi al trattamento dipende dal fine ultimo dello studio di DL (paragrafo 23) e deve garantire che tutti gli stadi di maturazione delle cellule germinali maschili siano valutati ai fini delle mutazioni letali dominanti (12).

8. Se è comprovato che la sostanza o i relativi metaboliti non raggiungono i testicoli, non è opportuno utilizzare questa prova.

PRINCIPIO DELLA PROVA

9. In generale, gli animali maschi sono esposti alla sostanza chimica in esame attraverso un'adeguata via d'esposizione e fatti accoppiare con femmine vergini non trattate. Possono essere testati diversi tipi di cellule germinali utilizzando diversi intervalli di accoppiamenti in sequenza. Successivamente all'accoppiamento le femmine sono soppresse dopo un periodo adeguato e i loro uteri sono esaminati per determinare il numero di embrioni impiantati e di embrioni vivi e morti. La letalità dominante di una sostanza chimica in esame è determinata raffrontando gli embrioni impiantati vivi per femmina nel gruppo trattato con gli embrioni impiantati vivi per femmina nel gruppo di controllo con solvente/mezzo disperdente. L'aumento degli embrioni impiantati morti per femmina nel gruppo trattato rispetto agli embrioni impiantati morti per femmina nel gruppo di controllo rispecchia la perdita post-impianto indotta dalla sostanza chimica. La perdita post-impianto è calcolata determinando il rapporto di embrioni impiantati morti sugli embrioni impiantati totali nel gruppo trattato rispetto al rapporto di embrioni impiantati morti sugli embrioni impiantati totale nel gruppo di controllo. La perdita pre-impianto può essere stimata sulla base del conteggio dei corpi lutei cui si sottraggono gli embrioni impiantati totali oppure attraverso il raffronto del totale degli embrioni impiantati per femmina nel gruppo trattato e in quello di controllo.

VERIFICA DELLA COMPETENZA DEL LABORATORIO

10. La competenza ad eseguire il presente metodo di prova è provata dimostrando la competenza a riprodurre frequenze di letalità dominante a partire da dati pubblicati (ad esempio (13) (14) (15) (16) (17) (18)) con sostanze chimiche utilizzate come sostanze di controllo positivo (incluse le risposte deboli) quali quelle elencate alla tabella 1 e controlli contenenti il mezzo disperdente e ottenendo frequenze di controllo negative coerenti con la serie di dati accettabili (cfr. riferimenti sopra) o, se disponibile, con la distribuzione dei controlli storici del laboratorio.

DESCRIZIONE DEL METODO

Preparazioni

Selezione delle specie animali

11. Di preferenza sono utilizzati individui sani sessualmente maturi, provenienti da ceppi di animali da laboratorio. Sono comunemente usati i topi, ma sono idonei anche i ratti. Si può ricorrere a qualsiasi altra specie idonea di mammiferi, se ciò viene giustificato scientificamente nella relazione.

Condizioni di stabulazione e alimentazione degli animali

12. Per i roditori, la temperatura dello stabulario deve essere mantenuta a 22 °C (± 3 °C). Idealmente l'umidità relativa deve essere del 50-60 %. Deve comunque essere come minimo del 40 % e non deve preferibilmente superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie degli ambienti. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce seguite da 12 ore di oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata d'acqua da bere. La scelta della dieta può essere influenzata dalla necessità di garantire un'adeguata miscela della sostanza in esame, se somministrata con questo metodo. Prima del trattamento o dell'accoppiamento, se non ci si aspetta o non si osserva alcun comportamento aggressivo, i roditori vanno alloggiati in piccoli gruppi (non più di cinque), dello stesso sesso, preferibilmente in gabbie a fondo pieno con adeguato arricchimento ambientale. Gli animali possono essere stabulati individualmente se ciò è giustificato dal punto di vista scientifico.

Preparazione degli animali

13. Gli animali adulti, sessualmente maturi, maschi e femmine, vengono suddivisi a caso in gruppi di controllo e di trattamento. Ciascun animale è identificato in modo univoco applicando un metodo incruento e il meno possibile invasivo (ad esempio inanellamento, etichettatura, applicazione di un microchip o identificazione biometrica, evitando il taglio delle orecchie o la falangectomia) e deve essere acclimatato alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. Deve essere evitata ogni contaminazione incrociata fra il controllo positivo e la sostanza chimica in esame. All'inizio dello studio la variazione di peso degli animali deve essere minima e non superare il ± 20 % del peso medio per ciascun sesso.

Preparazione delle dosi

14. Le sostanze chimiche in esame solide vanno sciolte o poste in sospensione in appropriati solventi o mezzi disperdenti o mescolate alla dieta o all'acqua da bere prima di essere somministrate agli animali. Le sostanze chimiche in esame liquide possono essere somministrate direttamente o diluite prima della somministrazione. In caso di esposizione per via inalatoria, le sostanze chimiche in esame possono essere somministrate sotto forma di gas, vapore o aerosol solido o liquido, in funzione delle loro proprietà fisico-chimiche. Le preparazioni della sostanza chimica in esame devono essere predisposte sul momento a meno di non disporre di dati che dimostrino la stabilità delle preparazioni in condizioni di stoccaggio e permettano di definire tali condizioni in modo adeguato.

Condizioni di prova

Solvente/mezzo disperdente

15. Il solvente/mezzo disperdente non deve produrre effetti tossici alle dosi usate e non si preveda che possa reagire chimicamente con la sostanza chimica in esame. L'uso di solventi/mezzi disperdenti poco noti è ammesso solo se suffragato da dati che ne provino la compatibilità. Se possibile si raccomanda di considerare in primo luogo l'uso di un solvente/mezzo disperdente acquoso. Fra gli esempi di solventi/mezzi disperdenti compatibili e comunemente usati si possono menzionare l'acqua, la soluzione fisiologica, la soluzione di metilcellulosa, la soluzione di carbossimetilcellulosa sodica, l'olio di oliva e l'olio di mais.

Controlli positivi

16. Vanno sempre utilizzati animali come controlli positivi concomitanti vanno sempre utilizzati animali, purché il laboratorio abbia dimostrato la propria competenza nell'effettuare la prova e abbia di recente (ad esempio negli ultimi 5 anni) usato la prova periodicamente. Non è tuttavia necessario trattare gli animali per i controlli positivi attraverso le stesse vie di esposizione degli animali cui è somministrata la sostanza chimica in esame, né prelevare un campione per ciascun intervallo di accoppiamento. Deve essere comprovato che le sostanze chimiche utilizzate per i controlli positivi inducono letalità dominante alle condizioni della prova. Gli animali dei gruppi di controllo dovranno essere trattati in modo identico agli animali del gruppo trattato, salvo per il trattamento.

17. Le dosi delle sostanze chimiche utilizzate come controlli positivi sono selezionate in modo da produrre effetti deboli o moderati che consentano di valutare criticamente le prestazioni e la sensibilità del metodo di prova ma che inducano sistematicamente mente effetti letali dominanti. Nella tabella 1 figurano esempi di sostanze chimiche per i controlli positivi con le relative dosi appropriate.

Tabella 1

Esempi di sostanze utilizzate per i controlli positivi

Sostanza (n. CAS) (N. di riferimento)	Intervallo di dosaggio effettivo (mg/kg) (specie di roditori)	Tempo di somministrazione (giorni)
Trietilenemelammina [51-18-3] (15)	0,25 (topi)	1
Ciclofosfammide [50-18-0] (19)	50-150 (topi)	5
Ciclofosfammide [50-18-0] (5)	25-100 (topi)	1
Metansolfonato di etile [62-50-0] (13)	100-300 (topi)	5
Acrilammide monomerico [79-06-1] (17)	50 (topi)	5
Clorambucil [305-03-3] (14)	25 (topi)	1

Controlli negativi

18. In ciascun momento di campionamento si includono animali che fungono da controllo negativo; a tali animali viene somministrato il solo solvente o mezzo disperdente e sono altrimenti trattati nello stesso modo dei gruppi di trattamento (20). In mancanza di dati su controlli storici o pubblicati che dimostrino che un solvente/mezzo disperdente prescelto non induce DL o altri effetti nocivi, in ciascun di campionamento si includono anche animali di controllo per stabilire l'accettabilità del controllo contenente il mezzo disperdente.

PROCEDURA

Numero di animali

19. Gli individui maschi sono fatti accoppiare in modo sequenziale a intervalli opportunamente predefiniti (ad esempio, a intervalli settimanali, paragrafi 21 e 23), di preferenza con una femmina vergine. Il numero di maschi per gruppo va predeterminato affinché sia sufficiente (in combinazione con il numero di femmine che vengono fatte accoppiare a ciascun intervallo di accoppiamento) al fine di ottenere la potenza statistica necessaria per osservare almeno un raddoppiamento della frequenza di DL (paragrafo 44).

20. Il numero di femmine per intervallo di accoppiamento va predeterminato mediante calcoli della potenza statistica che consentano di osservare almeno un raddoppiamento della frequenza di DL (ossia, un numero sufficiente di femmine gravide che forniscano almeno 400 embrioni impiantati totali) (20) (21) (22) (23) e che preveda almeno un embrione impiantato morto per unità di analisi (ossia, gruppo di accoppiamento per dose) (24).

Periodo di somministrazione e intervalli di accoppiamento

21. Il numero di intervalli di accoppiamento successivi al trattamento è determinato dal programma di trattamento adottato, e deve essere garantire che tutti gli stadi delle cellule germinali maschili siano valutati ai fini di DL (12) (25). Per un singolo trattamento fino a 5 dosi somministrate quotidianamente, vanno calcolati 8 (per i topi) o 10 (per i ratti) accoppiamenti condotti con una settimana d'intervallo dopo l'ultimo trattamento. Per la somministrazione di dosi multiple, il numero di intervalli di accoppiamento è ridotto proporzionalmente al prolungamento del periodo di somministrazione, mantenendo tuttavia l'obiettivo di valutare tutti gli stadi della spermatogenesi (ad esempio, dopo un'esposizione di 28 giorni, sono sufficienti solo 4 accoppiamenti settimanali per valutare tutti gli stadi della spermatogenesi nei topi). Tutti i calendari di trattamento e accoppiamento vanno giustificati sotto il profilo scientifico.

22. Le femmine restano con i maschi almeno per la durata di un ciclo estrale (ad esempio, una settimana copre un ciclo estrale sia nei topi che nei ratti). Le femmine che non si sono accoppiate durante l'intervallo settimanale possono essere utilizzate per un successivo intervallo di accoppiamento o, in alternativa, fino a che sia avvenuto l'accoppiamento, da determinare in base alla presenza di sperma nella vagina o di un tappo vaginale.

23. Il regime di esposizione e di accoppiamento utilizzato dipende dallo scopo ultimo dello studio di DL. Se l'obiettivo è determinare se una data sostanza chimica induca mutazioni di DL *tout court*, allora il metodo accettato consisterà nell'esporre un intero ciclo di spermatogenesi (ad esempio, 7 settimane nel topo, 5-7 trattamenti/settimana) con accoppiamento alla fine. Se tuttavia l'obiettivo è individuare il tipo di cellule germinali sensibili all'induzione di DL, allora è preferibile un'esposizione unica o di 5 giorni seguita da un accoppiamento settimanale.

Livelli di dose

24. Se viene effettuato uno studio preliminare di *range-finding* perché non sono già disponibili dati appropriati per orientare la scelta delle dosi, tale studio deve essere svolto nello stesso laboratorio, usando specie, ceppi, sesso e regime di trattamento identici a quelli che saranno utilizzati nello studio principale (26). Lo studio serve a individuare la dose massima tollerata (MTD), definita come la dose più alta che sarà tollerata per la durata della prova senza che si manifesti una tossicità che limita lo studio (ad esempio, reazioni o comportamenti anormali, perdita di peso moderata o citotossicità del tessuto interessato), ma senza provocare morte o segni di dolore, sofferenza o stress che rendano necessaria una soppressione incruenta degli animali (27).

25. La MTD non deve inoltre avere effetti negativi sulla riuscita dell'accoppiamento (21).

26. Sostanze chimiche in esame con azione biologica specifica, a dosi basse non tossiche (come ormoni e mitogeni) e sostanze chimiche che comportano saturazione delle caratteristiche tossicocinetiche possono costituire eccezioni rispetto ai criteri di definizione della dose e vanno valutate caso per caso.

27. Per ottenere informazioni sulla relazione dose-risposta, uno studio completo deve includere un gruppo di controllo negativo e almeno tre livelli di dose, generalmente separati da un fattore 2, ma non superiore a 4. Per contro, se la sostanza chimica in esame non provoca alcuna tossicità nell'ambito di un test di *range-finding* o secondo quanto emerge dai dati esistenti, la dose massima per una singola somministrazione deve essere di 2 000 mg/kg di peso corporeo. Se la sostanza chimica in esame provoca invece tossicità, la MTD deve corrispondere alla dose più elevata somministrata, e i livelli di dose utilizzati devono essere compresi in un intervallo che va dalla tossicità massima a una tossicità modica o assente. Per le sostanze chimiche non tossiche, la dose limite per un periodo di somministrazione di 14 giorni o più, la dose limite è 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno e per periodi di somministrazione inferiori a 14 giorni la dose limite è di 2 000 mg/kg di peso corporeo/giorno.

Somministrazione delle dosi

28. Nella concezione di una prova va considerata la via d'esposizione umana prevista. Pertanto possono essere scelte, se giustificate, vie di somministrazione quali l'alimentazione, l'acqua potabile, la via sottocutanea, la via endovenosa, l'applicazione topica, la via orale (sonda gastrica), inalatoria o l'impianto. In ogni caso, deve essere scelta la via che garantisce un'adeguata esposizione del o dei tessuti bersaglio. L'iniezione intraperitoneale non è generalmente raccomandata in quanto non si tratta di una via di esposizione umana prevista, e va utilizzata solo con una specifica giustificazione scientifica. Se la sostanza chimica in esame è miscelata nell'alimentazione o nell'acqua occorre fare attenzione, specialmente nei casi di dosaggio singolo, che il lasso di tempo fra l'assunzione del cibo e dell'acqua e l'accoppiamento sia sufficiente per permettere l'individuazione degli effetti (paragrafo 31). Il volume massimo di liquido somministrabile in una sola volta con sonda gastrica o con iniezione dipende dalle dimensioni dell'animale da laboratorio. Esso non deve generalmente essere superiore a 1 ml/100 g di peso corporeo, tranne nel caso delle soluzioni acquose che possono essere somministrate in quantità pari a massimo 2 ml/100 g di peso corporeo. L'uso di volumi maggiori (se consentito dalla legislazione in materia di benessere degli animali) deve essere giustificato. La variabilità del volume somministrato deve essere ridotta al minimo adeguando la concentrazione, in modo da garantire la somministrazione di un volume costante in relazione al peso corporeo per tutti i livelli di dose.

Osservazioni

29. Gli animali sperimentali devono essere oggetto di osservazioni cliniche generali e i segni clinici devono essere registrati almeno una volta al giorno, preferibilmente alla stessa o alle stesse ore e tenendo conto del periodo di massima intensità degli effetti previsti dopo la somministrazione. Almeno due volte al giorno, durante il periodo di somministrazione, tutti gli animali vengono esaminati al fine di determinare la morbilità e la mortalità. Tutti gli animali sono pesati all'inizio dello studio, almeno una volta alla settimana nel corso degli studi a dosi ripetute, e al momento della soppressione incruenta. La misurazione del consumo di cibo va eseguita almeno con cadenza settimanale. Se la sostanza chimica in esame è diluita in acqua prima di essere somministrata, il consumo di acqua va misurato ad ogni cambio dell'acqua e almeno una volta alla settimana. Gli animali che manifestano segni di tossicità eccessiva non letale vanno soppressi prima del completamente del metodo di prova (27).

Raccolta e trattamento dei tessuti

30. Le femmine sono soppresse in maniera incruenta durante la seconda metà della gestazione, al giorno 13 per i topi e al giorno 14-15 per i ratti. I loro uteri sono esaminati per individuare effetti letali dominanti e per determinare il numero di embrioni impiantati, di embrioni vivi e morti nonché di corpi lutei.

31. Le corna uterine e le ovaie sono esposte per il conteggio dei corpi lutei e i feti sono rimossi, conteggiati e pesati. Occorre esaminare con attenzione gli uteri per individuare e conteggiare tutti i riassorbimenti, compresi i riassorbimenti occultati da feti viventi. È registrata la mortalità fetale. Si registrano anche il numero di femmine gravide con successo e il numero di embrioni impiantati totali e di perdite pre-impianto nonché la mortalità post-impianto (inclusi i riassorbimenti precoci e tardivi). Inoltre i feti visibili sono conservati mediante fissativo di Bouin per almeno due settimane, cui fa seguito un esame per individuare gravi malformazioni esterne (28), onde ottenere maggiori informazioni sugli effetti sulla riproduttività e sullo sviluppo dell'agente in esame.

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

32. I dati devono essere disposti in forma di tabelle con indicazione del numero dei maschi accoppiati, del numero delle femmine gravide e del numero delle femmine non gravide. I risultati di ciascun accoppiamento, con indicazione dell'identità dei singoli soggetti maschi e femmine, vanno riportati individualmente. Per ciascuna femmina sono indicati l'intervallo di accoppiamento, i livelli di dose ricevuti dai maschi trattati e il numero di embrioni impiantati vivi e morti.

33. La perdita post-impianto è calcolata determinando il rapporto di embrioni impiantati morti sugli embrioni impiantati totali nel gruppo trattato rispetto al rapporto di embrioni impiantati morti sugli embrioni impiantati totali nel gruppo di controllo con mezzo disperdente/solvente.

34. La perdita pre-impianto è calcolata come differenza fra il numero dei corpi lutei e il numero degli embrioni impiantati, oppure come riduzione del numero medio di embrioni impiantati per femmina rispetto agli accoppiamenti di controllo. Se la perdita pre-impianto viene stimata, tale dato deve essere registrato.

35. Il fattore di letalità dominante è stimato come: (morti pre-impianto/totale di embrioni impiantati per femmina) × 100.

36. Nella relazione devono figurare i dati sulla tossicità e i segni clinici (descritti al paragrafo 29).

Criteri di accettabilità

37. L'accettabilità della prova si basa sui seguenti criteri:

— I controlli negativi concomitanti sono coerenti con le norme pubblicate per i dati relativi ai controlli negativi storici e con i dati dei controlli storici del laboratorio, se disponibili (cfr. i paragrafi 10 e 18);

— i controlli positivi concomitanti inducono risposte coerenti con le norme pubblicate per i dati relativi ai controlli positivi storici, o con le banche dati dei controlli positivi storici del laboratorio, se disponibili ed evidenziano un incremento statisticamente significativo rispetto ai controlli negativi (cfr. i paragrafi 17 e 18);

— un numero adeguato di embrioni impiantati totali e di dosi è analizzato (paragrafo 20);

— i criteri di selezione della dose massima sono coerenti con quelli descritti ai paragrafi 24 e 27.

Analisi e interpretazione dei risultati

38. Almeno tre gruppi esposti alla sostanza in esame devono essere analizzati al fine di ottenere dati sufficienti per l'analisi della relazione dose-risposta.

39. A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è ritenuta chiaramente positiva se:

— almeno una delle dosi sperimentali presenta un incremento statisticamente significativo rispetto al concomitante controllo negativo;

— un test appropriato mostra che l'aumento è correlato alla dose in almeno una condizione sperimentale (ad esempio un intervallo di accoppiamento settimanale); e

— uno o più risultati si situano al di fuori della serie accettabile di dati relativi ai controlli negativi storici o della distribuzione dei dati relativi ai controlli negativi storici del laboratorio (ad esempio limite di controllo al 95 % in base alla distribuzione di Poisson), se disponibili.

La sostanza chimica in esame è quindi ritenuta in grado di indurre mutazioni letali dominanti nelle cellule germinali degli animali sperimentali. Raccomandazioni relative ai metodi statistici più appropriati sono descritte nel paragrafo 44; in letteratura è possibile trovare altri approcci statistici raccomandati (20) (21) (22) (24) (29). L'animale deve essere considerato come unità sperimentale nei metodi statistici utilizzati.

40. A condizione che siano stati rispettati tutti i criteri di accettabilità, una sostanza chimica in esame è considerata chiaramente negativa se:

— nessuna delle dosi sperimentali presenta un incremento statisticamente significativo rispetto al concomitante controllo negativo;

— non si registrano aumenti correlati alla dose in nessuna condizione sperimentale; e

— tutti i risultati si situano entro la serie accettabile di dati relativi ai controlli negativi storici o dei dati relativi ai controlli negativi storici del laboratorio (ad esempio limiti di controllo al 95 % in base alla distribuzione di Poisson), se disponibili.

La sostanza chimica in esame è quindi ritenuta non in grado di indurre mutazioni letali dominanti nelle cellule germinali degli animali sperimentali.

41. Non è necessario verificare una risposta chiaramente positiva o chiaramente negativa.

42. Se la risposta non è chiaramente negativa né chiaramente positiva e per stabilire la rilevanza biologica di un risultato (ad esempio un aumento debole o marginale), i dati sono sottoposti al giudizio di esperti e/o a indagini più approfondite, avvalendosi dei dati sperimentali esistenti, ad es. quelli che indicano che il risultato positivo si situa al di fuori della serie accettabile di dati relativi ai controlli negativi storici o dei dati relativi ai controlli negativi storici del laboratorio (30).

43. In rari casi, anche dopo ulteriori analisi, quando la serie di dati non consente di valutare i risultati come positivi o negativi, i risultati sono dichiarati equivoci.

44. I metodi statistici considerano l'animale maschio come unità sperimentale. Sebbene sia possibile che i dati di conteggio (ad esempio numero di embrioni impiantati per femmina) seguano la distribuzione di Poisson e/o le proporzioni (ad esempio la proporzione di embrioni impiantati morti) seguano una distribuzione binomiale, si osserva spesso una sovradispersione di tali dati (31). Di conseguenza l'analisi statistica dovrebbe inizialmente avvalersi di una prova che accerti la sotto- o sovradispersione mediante test di varianza, mediante test di varianza binomiale di Cochran (32) o il test C(α) di sovradispersione binomiale di Tarone (31) (33). Se non si osserva alcuna deviazione dalla dispersione binomiale, possono essere effettuati il test di Cochran-Armitage per il trend per le tendenze delle proporzioni fra i diversi livelli di dose (34) e raffronti a coppie con il gruppo di controllo applicando il test esatto di Fischer (35). Analogamente, se non si osserva alcuna dispersione dalla distribuzione di Poisson, le tendenze dei conteggi possono essere testate con la regressione di Poisson (36) e si possono effettuare raffronti a coppie con il gruppo di controllo nell'ambito del modello di Poisson, per mezzo di contrasti a coppie (36). Qualora si osservi una sovra- o sottodispersione, si raccomanda di ricorrere a metodi non parametrici (23) (31). Fra questi si annoverano test basati sui ranghi, quali il test di Jonckheere-Terpstra per la tendenza (37) e i test di Mann-Whitney (38) per i raffronti a coppie con il gruppo di controllo contenente il mezzo disperdente/solvente nonché i test di permutazione, ricampionamento o bootstrapping per la tendenza e i raffronti per coppie con il gruppo di controllo (31) (39).

45. Un metodo di prova DL positivo conferma la genotossicità della sostanza chimica in esame nelle cellule germinali dei maschi trattati della specie sperimentale.

46. Il fatto di stabilire se i valori osservati rientrano o trascendono l'intervallo storico dei controlli storici può fornire informazioni importanti ai fini della valutazione della significatività biologica della risposta (40).

Relazione sull'esecuzione della prova

47. I seguenti dati devono figurare nella relazione sull'esecuzione della prova.

Sintesi

Sostanza chimica in esame:

— origine, numero di lotto e data di scadenza, se disponibile;

— stabilità della sostanza chimica in esame, se nota.

— solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente, se note;

— misurazione del pH, dell'osmolalità e del precipitato nel terreno di coltura al quale è stata aggiunta la sostanza chimica in esame, se del caso.

Sostanza monocostituente:

— aspetto fisico, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche;

— identificazione chimica, come la denominazione IUPAC o CAS, il numero CAS, il codice SMILES o InChI, la formula strutturale, la purezza, l'identità chimica delle impurezze, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc.

Sostanza multicostituente, UVCB e miscele:

— caratterizzate nella massima misura possibile con l'identità chimica (vedasi sopra), con la presenza quantitativa e con le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti.

Preparazione della sostanza chimica in esame:

— motivazione della scelta del mezzo disperdente;

— solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/mezzo disperdente, se note;

— preparazione dei preparati per somministrazione per via alimentare, con l'acqua da bere e per inalazione;

— determinazione analitica dei preparati (ad esempio stabilità, omogeneità, concentrazioni nominali), se effettuata.

Animali utilizzati nella prova:

— specie/ceppi usati e giustificazione della scelta;

— numero, età e sesso degli animali;

— origine, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.;

— metodo di identificazione univoca degli animali;

— per gli studi a breve termine: peso di ciascun maschio all'inizio e alla fine della prova; per gli studi di durata superiore a una settimana: peso di ciascun individuo durante lo studio e consumo di cibo. Devono essere inclusi l'intervallo, la media e la deviazione standard per ciascun gruppo.

Condizioni sperimentali:

— dati sui controlli positivi e negativi (mezzo disperdente/solvente);

— dati della prova per determinare l'intervallo delle dosi;

— criteri di selezione delle dosi;

— dettagli della preparazione della sostanza in esame;

— modalità precise di somministrazione della sostanza chimica in esame;

— criteri di selezione della via di somministrazione;

— metodi di misurazione della tossicità animale, comprese, se disponibili, analisi istopatologiche o ematologiche e la frequenza con cui è stato misurato il peso corporeo e sono state realizzate osservazioni sugli animali;

— metodi atti a verificare che la sostanza in esame ha raggiunto il tessuto bersaglio o la circolazione sanguigna, se i risultati sono negativi;

— dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno) calcolata in funzione della concentrazione (ppm) della sostanza chimica in esame contenuta nella dieta/acqua da bere e del consumo, se del caso;

— dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua;

— dettagli sull'arricchimento ambientale delle gabbie;

— descrizione dettagliata dello schema di trattamento e di campionamento e giustificazione delle scelte;

— metodo di analgesia;

— metodo di soppressione incruenta degli animali;

— procedure di isolamento e di conservazione dei tessuti;

— origine e numeri di lotto di tutti i kit e reagenti, se del caso;

— metodi di enumerazione delle mutazioni letali dominanti;

— ordine degli accoppiamenti;

— metodi usati per stabilire l'avvenuto accoppiamento;

— momento della soppressione incruenta;

— criteri per conteggiare gli effetti di DL, inclusi i corpi lutei, gli embrioni impiantati, i riassorbimenti e le perdite pre-impianto, gli embrioni impiantati vivi e morti.

Risultati:

— condizioni dell'animale prima e durante il periodo di saggio, compresi i segni di tossicità;

— peso corporeo dei maschi durante i periodi di trattamento e di accoppiamento;

— numero di femmine accoppiate;

— relazione dose-risposta, ove possibile;

— dati sui controlli negativi storici e concomitanti, con intervalli, medie e deviazioni standard;

— dati sui controlli positivi concomitanti;

— dati tabulati per ciascuna femmina gravida, compresi: numero di corpi lutei per ciascuna femmina; numero di embrioni impiantati per ciascuna femmina; numero di riassorbimenti e di perdite pre-impianto per ciascuna femmina; numero di embrioni impiantati vivi per ciascuna femmina; numero di embrioni impiantati morti per ciascuna femmina; peso dei feti;

— i dati di cui sopra sintetizzati per ciascun periodo di accoppiamento e dose, con l'indicazione delle frequenze di letalità dominante;

— analisi e metodi statistici applicati.

Discussione dei risultati

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

(2) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.*(Eds.) pp. 235-334, Elsevier, Amsterdam

(3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., and Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group «Dominant» lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol., 39*, 173-185

(4) Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. Mutation Res,. 352:159-167.

(5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. and Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. Mutation Res., 48:267-270.

(6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. and Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. Mutation Res., 397:77-74.

(7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. and Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol.* Lett. 20:325-329.

(8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. and Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. Fundam. Appl. *Toxicol.*, 3:80-85.

(9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., and Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, Mutation Res., 33, 239-249.

(10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. and Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. Biol. Reprod., 70:616-624.

(11) Marchetti F. and Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. Birth Defects Res., C 75:112-129.

(12) Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. Mutation Res., 352:169-172.

(13) Favor J., and Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, Mutation Res., 53: 21–27.

(14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. and Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. Mutation Res., 345:167-180.

(15) Hastings S.E., Huffman K.W. and Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, Mutation Res., 40:371-378.

(16) James D.A. and Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, Mutation Res., 99:303-314.

(17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. and Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. Mutation Res., 173:35-40.

(18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. and Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, Mutation Res., 296: 143-156.

(19) Holstrom L.M., Palmer A.K. and Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In Supplementary Mutagenicity Tests. Kirkland D.J. and Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 129-156.

(20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417:19–30.

(21) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312:313-318.

(22) Generoso W.M. and Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. Methods, *Toxicol.*, 3A:124-141.

(23) Haseman J.K. and Soares E.R. (1976).The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. Mutation. Res., 41: 277-288.

(24) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, Teratogen. Carcinogen. *Mutagen.*, 1:353 – 360.

(25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., and Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. Mutation. Res., 85:417-429.

(26) Fielder R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagen., 7:313-319.

(27) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(28) Barrow M.V., Taylor W.J and Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306.

(29) Kirkland D.J., (Ed.)(1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.

(30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. and Thybaud V. (2011). «Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data», Mutation. Res., 723:87-90.

(31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. and Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. Mutation. Res., 272:35-58.

(32) Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. Biometrics, 10: 417-451.

(33) Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585-590.

(34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. In *Encyclopedia of* Statistical Sciences, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Eds.), pp. 334-336. John Wiley and Sons, New York.

(35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).

(36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, Chapters 14 and 17. McGraw-Hill, Boston

(37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika,* 41:133-145.

(38) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York

(39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.

(40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

Appendice 1

DEFINIZIONI

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Corpi lutei: la struttura secernente ormoni che si forma nell'ovaio a seguito della trasformazione del follicolo che ha rilasciato l'ovocita. Il numero di corpi lutei nelle ovaie corrisponde al numero di ovociti prodotti.

Mutazione letale dominante: mutazione che si verifica in una cellula germinale o che si fissa dopo la fecondazione e che causa la morte dell'embrione o del feto.

Tasso di fertilità: il numero di femmine accoppiate gravide sul numero di femmine accoppiate.

Intervallo di accoppiamento: il tempo trascorso tra la fine dell'esposizione e l'accoppiamento dei maschi trattati. Il controllo di questo intervallo permette di valutare gli effetti della sostanza chimica sui diversi tipi di cellule germinali. Nei topi che si accoppiano durante la settimana n. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 dopo la fine dell'esposizione si misurano gli effetti su spermatozoi, spermatidi condensati, spermatidi tondeggianti, spermatociti in fase pachitene, spermatociti in fase precoce, spermatogoni differenziati, spermatogoni in fase di differenziazione e spermatogoni differenziati.

Perdita pre-impianto: discrepanza fra il numero degli embrioni impiantati e il numero dei corpi lutei. Può essere stimata anche mediante il raffronto fra gli embrioni impiantati totali per femmina nei gruppi trattati e di controllo.

Perdita post-impianto: il rapporto di embrioni impiantati morti sugli embrioni impiantati totali nel gruppo trattato rispetto al rapporto di embrioni impiantati morti sugli embrioni impiantati totali nel gruppo di controllo.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata applicando il presente metodo di prova.

UVCB: sostanza di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali biologici.

Appendice 2

TEMPI DI SPERMATOGENESI NEI MAMMIFERI

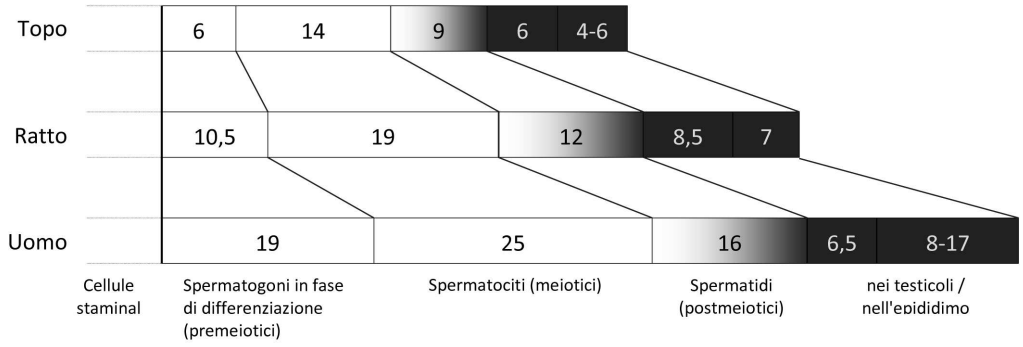


Figura 1. Raffronto della durata (in giorni) dello sviluppo delle cellule germinali maschili nei topi, nei ratti e nell'uomo. La riparazione del DNA non avviene nei periodi ombreggiati.

Rappresentazione schematica del ciclo della spermatogenesi nel topo, nel ratto e nell'uomo (da Adler, 1996). Gli spermatogoni indifferenziati includono spermatogoni di tipo: A-single; A-paired; e A-aligned (Hess & de Franca, 2008). Gli spermatogoni A-single sono considerati le vere e proprie cellule staminali; pertanto per valutare gli effetti sulle cellule staminali devono trascorrere almeno 49 giorni (nel topo) fra l'ultima iniezione della sostanza chimica in esame e l'accoppiamento.

Riferimenti

Adler, ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. Mutat Res, ?br aus=y?>352:169-172.

Hess, RA, De Franca LR (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences and Springer Science&Business Media:1-15."

4) Nella parte B, il capitolo B.23 è sostituito dal seguente:

"B.23 **SAGGIO DI ABERRAZIONE CROMOSOMICA SUGLI SPERMATOGONI DI MAMMIFERO**

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 483 (2016). I metodi di prova vengono periodicamente rivisti alla luce dei progressi scientifici, delle mutevoli esigenze in materia di regolamentazione nonché di considerazioni relative al benessere degli animali. La presente versione modificata del metodo di prova riflette molti anni di esperienza con questo saggio e tiene conto delle possibilità di integrare o combinare questa prova con altri studi di tossicità o genotossicità; Combinare diversi studi di tossicità permetterebbe, potenzialmente, di ridurre il numero di animali usati nelle prove di tossicità. Il presente metodo di prova è parte integrante di una serie di metodi di prova sulla tossicologia genetica. L'OCSE ha elaborato un documento contenente informazioni succinte sulle prove di tossicologia genetica e un compendio delle modifiche recentemente apportate alle linee guida dell'OCSE in tale materia (1).

2. Il saggio *in vivo* di aberrazione cromosomica sugli spermatogoni di mammifero è destinato ad identificare le sostanze chimiche che causano aberrazioni cromosomiche strutturali nelle cellule spermatogoniali di mammifero (2) (3) (4). Questa prova è inoltre rilevante per valutare la genotossicità. Difatti, benché possano variare a seconda delle specie, i fattori del metabolismo *in vivo*, gli aspetti farmacocinetici e i processi di riparazione del DNA sono attivi e contribuiscono alle risposte. Questo metodo di prova non è stato elaborato per misurare le aberrazioni numeriche e non è comunemente usato per questo scopo.

3. Questo metodo di prova misura le aberrazioni cromosomiche strutturali (di tipo cromosomico e cromatidico) nella divisione degli spermatogoni e pertanto dovrebbe permettere di prevedere l'induzione di mutazioni ereditabili in tali cellule germinali.

4. Le definizioni dei termini fondamentali figurano nell'appendice.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

5. Nel presente metodo di prova si usano generalmente roditori, ma in certi casi si può ricorrere anche ad altre specie se ciò è giustificato sul piano scientifico. Le preparazioni citogenetiche standard di testicoli di roditori generano metafasi mitotiche (spermatogoni) e meiotiche (spermatociti). Le metafasi mitotiche e meiotiche sono identificate in base alla morfologia dei cromosomi (4). La prova citogenetica *in vivo* rivela aberrazioni cromosomiche strutturali nelle mitosi degli spermatogoni. Altre cellule bersaglio non sono oggetto del presente metodo di prova.

6. Per rilevare aberrazioni di tipo cromatidico negli spermatogoni, è necessario esaminare la prima divisione cellulare mitotica dopo il trattamento, prima che tali aberrazioni evolvano in aberrazioni di tipo cromosomico nelle successive divisioni cellulari. L'analisi dei cromosomi allo stadio della meiosi, per individuare aberrazioni cromosomiche strutturali allo stadio della diacinesi-metafase I e metafase II può fornire ulteriori informazioni sugli spermatociti trattati.

7. I testicoli contengono diverse generazioni di spermatogoni (5). Questi diversi tipi di cellule germinali possono presentare sensibilità diverse al trattamento chimico. Le aberrazioni individuate rappresentano pertanto una risposta aggregata delle popolazioni di cellule spermatogoniali trattate. La maggioranza delle cellule mitotiche nelle preparazioni di testicoli consiste in spermatogoni di tipo B, il cui un ciclo cellulare è di circa 26 ore (3).

8. Se è comprovato che la sostanza chimica in esame o i relativi metaboliti non raggiungono i testicoli, non è opportuno utilizzare questa prova.

PRINCIPIO DELLA PROVA

9. Generalmente gli animali sono esposti alla sostanza chimica in esame attraverso un'adeguata via d'esposizione, e al momento opportuno, dopo il trattamento, sono soppressi in maniera incruenta. Prima della soppressione incruenta, gli animali sono trattati con un inibitore della metafase (ad esempio colchicina o Colcemid®). Le preparazioni cromosomiche approntate dalle cellule germinali sono poi sottoposte a un processo di colorazione, e le cellule in metafase sono analizzate per individuare aberrazioni cromosomiche.

VERIFICA DELLA COMPETENZA DEL LABORATORIO

10. La competenza sperimentale ad eseguire il presente metodo di prova è provata dimostrando la competenza a riprodurre i risultati attesi delle frequenze di aberrazioni cromosomiche strutturali negli spermatogoni con sostanze chimiche utilizzate come sostanze di controllo positivo (incluse le risposte deboli), quali quelle elencate alla tabella 1 e ottenendo frequenze di controllo negative coerenti con la serie di dati accettabile di dati di controllo riportati dalla letteratura pubblicata (ad esempio (2)(3)(6)(7)(8)(9)(10)) o, se disponibile, con la distribuzione dei controlli storici del laboratorio.

DESCRIZIONE DEL METODO

Preparazioni

Selezione delle specie animali

11. Di preferenza sono utilizzati individui adulti, giovani e in buona salute, provenienti da ceppi di animali da laboratorio. Generalmente si usano topi maschi; tuttavia, qualora ciò sia scientificamente giustificato, e per consentire la combinazione con un'altra prova, possono essere utilizzati maschi di altre specie idonee di mammiferi. L'utilizzazione di specie diverse dai roditori deve essere scientificamente giustificata nella relazione.

Condizioni di stabulazione e alimentazione degli animali

12. Per i roditori, la temperatura dello stabulario deve essere mantenuta a 22 °C (± 3 °C). Idealmente l'umidità relativa deve essere del 50-60 %. Deve comunque essere come minimo del 40 % e non deve preferibilmente superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie degli ambienti. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 di oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata d'acqua da bere. La scelta della dieta può essere influenzata dalla necessità di garantire un'adeguata miscela della sostanza in esame, se somministrata per questa via. Se non ci si aspetta alcun comportamento aggressivo i roditori vanno alloggiati in piccoli gruppi (non più di cinque in ogni gabbia), preferibilmente in gabbie a fondo pieno con adeguato arricchimento ambientale. Gli animali possono essere stabulati individualmente se ciò è giustificato dal punto di vista scientifico.

Preparazione degli animali

13. Sono generalmente utilizzati animali maschi adulti, giovani e sani (età 8-12 settimane all'inizio del trattamento), che vengono suddivisi a caso in gruppi di controllo e di trattamento. Ciascun animale è identificato in modo univoco applicando un metodo incruento e il meno possibile invasivo (cioè inanellamento, etichettatura, applicazione di un microchip o identificazione biometrica, evitando il taglio delle orecchie o la falangectomia) e deve essere acclimatato alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. Deve essere evitata ogni contaminazione incrociata fra il controllo positivo e la sostanza chimica in esame. All'inizio dello studio le variazioni di peso tra gli animali devono essere minime e non superare ± 20 %.

Preparazione delle dosi

14. Le sostanze chimiche in esame solide vanno sciolte o poste in sospensione in appropriati solventi o mezzi disperdenti o mescolate alla dieta o all'acqua da bere prima di essere somministrate agli animali. Le sostanze chimiche in esame liquide possono essere somministrate direttamente o diluite prima della somministrazione. In caso di esposizione per via inalatoria, le sostanze possono essere somministrate sotto forma di gas, vapore o aerosol solido o liquido, in funzione delle loro proprietà fisico-chimiche. Le preparazioni della sostanza chimica in esame devono essere predisposte sul momento a meno di non disporre di dati che dimostrino la stabilità delle preparazioni in condizioni di stoccaggio e permettano di definire tali condizioni in modo adeguato.

Condizioni di prova - Solvente/mezzo disperdente

15. Il solvente/mezzo disperdente non deve produrre effetti tossici ai livelli di dose usati e non deve poter reagire chimicamente con la sostanza in esame. L'uso di solventi/mezzi disperdenti poco noti è ammesso solo se suffragato da dati che ne provino la compatibilità. Se possibile si raccomanda di considerare in primo luogo l'uso di un solvente/mezzo disperdente acquoso. Fra gli esempi di solventi/mezzi disperdenti compatibili e comunemente usati si possono menzionare l'acqua, la soluzione fisiologica, la soluzione di metilcellulosa, la soluzione di carbossimetilcellulosa sodica, l'olio di oliva e l'olio di mais. In mancanza di dati sui controlli storici o pubblicati che dimostrino che un solvente/mezzo disperdente atipico prescelto non induce aberrazioni cromosomiche strutturali e altri effetti nocivi, va effettuato uno studio iniziale per stabilire l'accettabilità del controllo contenente il solvente/mezzo disperdente.

Controlli positivi

16. Vanno sempre utilizzati animali come controlli positivi concomitanti, purché il laboratorio abbia dimostrato la propria competenza nell'effettuare la prova e abbia di recente (ad es. negli ultimi 5 anni) usato la prova periodicamente. Quando manca un gruppo di controllo positivo concomitante, in ogni esperimento devono essere inclusi controlli del conteggio (vetrini fissati e non colorati). Questo può avvenire includendo nel conteggio dello studio campioni di riferimento idonei ottenuti e conservati in occasione di un esperimento separato di controllo positivo svolto periodicamente (ad esempio ogni 6-18 mesi) nel laboratorio in cui è condotta la prova; ad esempio, durante la dimostrazione della competenza del laboratorio e successivamente con cadenza periodica, se necessario.

17. Le sostanze chimiche per i controlli positivi devono produrre, in modo affidabile, un aumento individuabile della frequenza delle cellule con aberrazioni cromosomiche strutturali rispetto al livello spontaneo. Le dosi dei controlli positivi devono essere scelte in modo che gli effetti siano chiari ma non rivelino immediatamente all'analista l'identità dei campioni codificati. Nella tabella 1 figurano esempi di sostanze per i controlli positivi.

Tabella 1

Esempi di sostanze da utilizzare per i controlli positivi

Sostanze chimiche [n. CAS] (n. di riferimento)
Ciclofosfamide (monoidrato) [n. CAS 50-18-0 (n. CAS 6055-19-2)] (9)
Cicloesilammina [n. CAS 108-91-8] (7)
Mitomicina C [n. CAS 50-07-7] (6)
Acrilammide monomerico [79-06-1] (10)
Trietilenmelammina [n. CAS 51-18-3] (8)

Controlli negativi

18. In ciascun momento di campionamento si includono animali che fungono da controllo negativo; a tali animali viene somministrato il solo solvente o mezzo disperdente e sono altrimenti trattati nello stesso modo dei gruppi di trattamento. In mancanza di dati sui controlli storici o pubblicati che dimostrino che un solvente/mezzo disperdente prescelto non induce aberrazioni cromosomiche o altri effetti nocivi, in ciascun momento di campionamento si includono animali di controllo non trattati per stabilire l'accettabilità del controllo contenente il mezzo disperdente di controllo.

PROCEDURA

Numero di animali

19. All'inizio dello studio, la dimensione stabilita del gruppo deve consentire di disporre, in ogni gruppo, di almeno 5 animali maschi. Questo numero di animali per gruppo è ritenuto sufficiente per fornire una potenza statistica sufficiente (ossia per osservare almeno un raddoppiamento della frequenza delle aberrazioni cromosomiche se il livello dei controlli negativi è pari a 1,0 % o superiore, con l'80 % di probabilità a un livello di significatività dello 0,05) (3) (11). A titolo di orientamento sul numero massimo di animali generalmente necessario, uno studio che prevede due momenti di campionamento e coinvolge tre gruppi di trattamento e un gruppo di controllo negativo concomitante, più un gruppo di controllo positivo (ogni gruppo composto da cinque animali dello stesso sesso) richiederebbe 45 animali.

Programma di trattamento

20. Le sostanze chimiche in esame vengono in generale somministrate un'unica volta (ossia come trattamento singolo). È possibile impiegare altri protocolli di trattamento, purché siano scientificamente giustificati.

21. Dopo il trattamento si procede al prelievo di due campioni nel gruppo cui è stata somministrata la dose massima. Poiché il tempo necessario affinché la sostanza o le sostanze chimiche in esame siano assorbite e metabolizzate e producano effetti sulla cinetica del ciclo cellulare può influire sul momento ottimale per l'individuazione delle aberrazioni cromosomiche, sono effettuati due campionamenti, uno precoce e uno tardivo, rispettivamente circa 24 e 48 ore dopo il trattamento. Per dosi diverse dalla dose massima è opportuno procedere al campionamento precoce di 24 ore (inferiore o uguale al ciclo cellulare degli spermatogoni di tipo B, ottimizzando così la probabilità di conteggiare le prime metafasi post-trattamento) dopo il trattamento, salvo sia noto che il campionamento in un momento diverso risulterebbe giustificato e più idoneo all'individuazione degli effetti.

22. Si possono usare ulteriori momenti di campionamento. Ad esempio nel caso di sostanze chimiche che producono effetti indipendenti dalla fase S, possono essere idonei tempi di campionamento più precoci (ossia meno di 24 ore).

23. Si può usare un regime di trattamento a dosi ripetute, ad esempio nel caso in cui la prova sia effettuata congiuntamente ad una prova su un endpoint diverso il cui periodo di somministrazione è di 28 giorni (ad esempio TM B.58); sono allora necessari gruppi aggiuntivi di animali al fine di tener conto dei diversi tempi di campionamento. Conseguentemente, l'idoneità di un siffatto programma deve essere giustificata sul piano scientifico e valutata caso per caso.

24. Prima della soppressione incruenta, agli animali si inietta per via intraperitoneale una dose adeguata di un inibitore della metafase (ad esempio Colcemid® o colchicina). Gli animali sono quindi campionati dopo un adeguato lasso di tempo. Per i topi e i ratti tale intervallo è di circa 3-5 ore.

Livelli di dose

25. Qualora venga effettuato uno studio preliminare per determinare l'intervallo delle dosi da somministrare, in quanto non sono disponibili dati adeguati da studi pertinenti che forniscano un orientamento in tal senso, tale studio deve essere effettuato nello stesso laboratorio, utilizzando specie, ceppi e regime di trattamento identici a quelli da utilizzare nello studio principale sulla base delle metodologie attualmente in uso per gli studi volti a determinare l'intervallo di concentrazione delle dosi (12). Lo studio deve essere finalizzato a individuare la dose massima tollerata (DMT), definita come la dose che provoca lievi effetti tossici in relazione alla durata dello studio (ad esempio, reazioni o comportamenti anormali, perdita di peso moderata o citotossicità del sistema ematopoietico), ma che non provoca la morte dell'animale o segni di dolore e sofferenza tali da renderne necessaria la soppressione (13).

26. La dose massima può essere definita anche come dose che produce qualche segno di tossicità negli spermatogoni (ad esempio una riduzione del rapporto tra cellule degli spermatogoni in mitosi e le cellule che si trovano nella prima e seconda metafase meiotica). Tale riduzione non deve superare il 50 %.

27. Le sostanze chimiche in esame con azione biologica specifica a dosi basse non tossiche (come ormoni e mitogeni) e le sostanze chimiche che presentano saturazione delle proprietà tossicocinetiche possono costituire eccezioni rispetto ai criteri di determinazione delle dosi e vanno valutate caso per caso.

28. Per ottenere informazioni sulla relazione dose-risposta, uno studio completo deve includere un gruppo di controllo negativo (paragrafo 18) e almeno tre livelli di dose, generalmente separati da un fattore 2, ma non superiore a 4. Se la sostanza chimica in esame non provoca alcuna tossicità nell'ambito di un *test di range-finding* o secondo quanto emerge dai dati esistenti, la dose massima per una singola somministrazione deve essere di 2 000 mg/kg di peso corporeo. Per contro, se la sostanza chimica in esame provoca tossicità, la MTD deve corrispondere alla dose più elevata somministrata, e i livelli di dose utilizzati devono essere compresi in un intervallo che va dalla tossicità massima a una tossicità modica o assente. Quando una tossicità del tessuto bersaglio (ad esempio i testicoli) è osservata a tutti i livelli di dose, è consigliabile un ulteriore studio con dosi non tossiche. Gli studi volti a descrivere più pienamente le informazioni quantitative sulla relazione dose-risposta possono richiedere gruppi di trattamento supplementari. Per certi tipi di sostanze chimiche in esame (ad esempio medicinali per uso umano) per le quali valgono specifici requisiti, i limiti possono variare. Se la sostanza chimica in esame produce effetti tossici, si seleziona la dose limite più due dosi inferiori (come sopra descritto). Per un periodo di somministrazione di 14 giorni o più, la dose limite è 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno e per periodi di somministrazione inferiori a 14 giorni la dose limite è di 2 000 mg/kg di peso corporeo/giorno.

Somministrazione delle dosi

29. Nella concezione di un saggio va considerata la via d'esposizione umana prevista. Pertanto possono essere scelte, se giustificate, vie di somministrazione quali l'alimentazione, l'acqua potabile, la via sottocutanea locale, la via endovenosa, la via orale (sonda gastrica), inalatoria o l'impianto. In ogni caso, si deve optare per la via che garantisce un'adeguata esposizione del tessuto bersaglio. Le iniezioni intraperitoneali non sono in genere raccomandate in quanto non costituiscono una via di esposizione umana fisiologica mente rilevante, a meno che ciò non risulti scientificamente giustificato. Se la sostanza chimica in esame è miscelata nell'alimentazione o nell'acqua occorre fare attenzione, specialmente nei casi di dosaggio singolo, che il lasso di tempo fra l'assunzione del cibo e dell'acqua e il campionamento sia sufficiente per consentire l'individuazione degli effetti (cfr. il paragrafo 33). Il volume massimo di liquido somministrabile in una sola volta con sonda gastrica o con iniezione dipende dalle dimensioni dell'animale da laboratorio. Esso non deve generalmente essere superiore a 1 ml/100 g di peso corporeo, tranne nel caso delle soluzioni acquose che possono essere somministrate in quantità pari a massimo 2 ml/100 g di peso corporeo. L'uso di volumi maggiori (se consentito dalla legislazione in materia di benessere degli animali) deve essere giustificato. La variabilità del volume somministrato deve essere ridotta al minimo adeguando la concentrazione, in modo da garantire la somministrazione di un volume costante in relazione al peso corporeo per tutti i livelli di dose.

Osservazioni

30. Gli animali sperimentali devono essere oggetto di osservazioni cliniche generali e i segni clinici devono essere registrati almeno una volta al giorno, preferibilmente alla stessa o alle stesse ore e tenendo conto del periodo di massima intensità degli effetti previsti dopo la somministrazione. Almeno due volte al giorno, tutti gli animali vengono esaminati al fine di determinarne la morbilità e la mortalità. Tutti gli animali devono essere pesati all'inizio dello studio, almeno una volta alla settimana nel corso degli studi a dosi ripetute, e al momento della soppressione incruenta. Nelle prove la cui durata è di almeno una settimana, la misurazione del consumo di cibo va eseguita almeno con cadenza settimanale. Se la sostanza chimica in esame è diluita in acqua prima di essere somministrata, il consumo di acqua va misurato ad ogni cambio dell'acqua e almeno una volta alla settimana. Gli animali che manifestano segni di tossicità eccessiva ma non letale vanno soppressi in maniera incruenta prima del completamento del metodo di prova (13).

Preparazione dei cromosomi

31. Le sospensioni di cellule germinali ottenute da uno o da entrambi i testicoli immediatamente dopo la soppressione incruenta sono esposte ad una soluzione ipotonica e fissate secondo protocolli stabiliti (ad esempio (2) (14) (15)). Le cellule vengono poi poste sui vetrini e colorate (16) (17). Tutti i vetrini sono codificati in modo che la loro identità non sia visibile all'analista.

Analisi

32. Si analizzano almeno 200 metafasi ben spaziate per ciascun animale (3) (11). Se la frequenza dei controlli negativi storici è < 1 %, per aumentare la potenza statistica si analizzano più di 200 cellule/animale (3). Si usano metodi di colorazione che consentano l'identificazione del centro mero.

33. Le aberrazioni di tipo cromatidico e cromosomico devono essere registrate separatamente e classificate in sottotipi (rotture, scambi). I gap sono registrati, ma non se ne tiene conto per determinare se una sostanza chimica induce incrementi significativi dell'incidenza di cellule che presentano aberrazioni cromosomiche. Le procedure in uso nel laboratorio devono garantire che l'analisi delle aberrazioni cromosomiche sia effettuata da analisti qualificati. Poiché le procedure di preparazione dei vetrini causano spesso la rottura di una parte delle cellule in metafase, con conseguente perdita di cromosomi, le cellule conteggiate devono quindi contenere un numero di centro meri non inferiore a $2n\pm2$, dove n è il numero aploide di cromosomi per quella specie.

34. Sebbene lo scopo della prova sia rilevare le aberrazioni cromosomiche strutturali, è importante registrare le frequenze di cellule poliploidi e di cellule che presentano cromosomi demoltiplicatore se si osservano tali eventi (cfr. il paragrafo 44).

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

35. I dati relativi a ciascun animale vanno presentati sotto forma di tabella. Per ciascun animale si valuta il numero di cellule con aberrazioni cromosomiche strutturali e il numero di aberrazioni cromosomiche per cellula. Occorre elencare separatamente le aberrazioni cromosomiche e quelle microclimatiche e classificarle in sottotipi (rotture, scambi) con l'indicazione del numero e della frequenza per i gruppi sperimentali e di controllo. I gap sono registrati separatamente. La frequenza dei gap viene indicata nella relazione, ma non viene generalmente inclusa nell'analisi della frequenza totale delle aberrazioni cromosomiche strutturali. Le percentuali di poliploidi e di cellule con cromosomi demoltiplicatore sono segnalate se osservate.

36. Devono figurare i dati sulla tossicità e i segni clinici (paragrafo 30).

Criteri di accettabilità

37. L'accettabilità della prova si basa sui seguenti criteri:

— I controlli negativi concomitanti sono coerenti con le norme pubblicate per i dati relativi ai controlli negativi storici, generalmente previste fra > 0 % e ≤ 1,5 % delle cellule che presentano aberrazioni cromosomiche e con i dati dei controlli storici del laboratorio se disponibili (cfr. i paragrafi 10 e 18).

— I controlli positivi concomitanti inducono risposte coerenti con le norme pubblicate per i dati relativi ai controlli storici positivi, o con le banche dati dei controlli storici positivi del laboratorio, se disponibili, ed evidenziano un incremento statisticamente significativo rispetto ai controlli negativi (cfr. i paragrafi 17, 18).

— È stato analizzato un numero adeguato di cellule e dosi (cfr. i paragrafi 28 e 32).

— I criteri di selezione della concentrazione massima sono conformi a quelli descritti ai paragrafi 25 e 26.

38. Se si osservano sia mitosi che meiosi, al fine di stabilire un eventuale effetto cito tossico si determina il rapporto fra le cellule degli spermatogoni in mitosi e le cellule che si trovano nella prima e seconda metafase meiotica per tutti gli animali trattati e per i controlli negativi, su un campione totale di 100 cellule in divisione per animale. Se si osservano solo mitosi, si determina l'indice mitotico in almeno 1 000 cellule per animale.

Analisi e interpretazione dei risultati

39. Almeno tre gruppi di trattamento trattati devono essere analizzati al fine di ottenere dati sufficienti per l'analisi della relazione dose-risposta.

40. A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è ritenuta chiaramente positiva se:

— almeno una delle dosi sperimentali presenta un incremento statisticamente significativo rispetto al concomitante controllo negativo;

— l'aumento è correlato alla dose almeno in uno dei momenti del campionamento; e

— uno o più risultati si situano al di fuori della serie accettabile di dati relativi ai controlli negativi storici o della distribuzione dei dati relativi ai controlli negativi storici (ad esempio limite di controllo al 95 % in base alla distribuzione di Poisson), se disponibili.

La sostanza chimica in esame è quindi ritenuta in grado di indurre aberrazioni cromosomiche nelle cellule degli spermatogoni degli animali sperimentali. Raccomandazioni sui metodi statistici più adeguati sono disponibili anche in letteratura (11) (18). L'animale deve essere considerato come unità sperimentale nei metodi statistici utilizzati.

41. A condizione che siano stati rispettati tutti i criteri di accettabilità, una sostanza chimica in esame è considerata chiaramente negativa se:

— nessuna delle dosi sperimentali presenta un incremento statisticamente significativo rispetto al concomitante controllo negativo;

— non si registrano aumenti correlati alla dose in nessuna condizione sperimentale; e

— tutti i risultati si situano entro la serie accettabile di dati relativi ai controlli negativi storici o dei dati relativi ai controlli negativi storici del laboratorio (ad esempio limite di controllo al 95 % in base alla distribuzione di Poisson), se disponibili.

La sostanza chimica in esame è quindi ritenuta non in grado di indurre aberrazioni cromosomiche nelle cellule degli spermatogoni degli animali sperimentali. Raccomandazioni sui metodi statistici più adeguati sono disponibili anche in letteratura (11) (18). Un risultato negativo non esclude la possibilità che la sostanza chimica possa indurre aberrazioni cromosomiche in fasi successive dello sviluppo non studiate oppure mutazioni geniche.

42. Non è necessario verificare una risposta chiaramente positiva o chiaramente negativa.

43. Se la risposta non è chiaramente negativa né chiaramente positiva, e per stabilire la rilevanza biologica di un risultato (ad esempio un aumento debole o marginale), i dati sono sottoposti al giudizio di esperti e/o a indagini più approfondite, avvalendosi dei dati sperimentali esistenti, ad es. quelli che indicano che il risultato positivo si situa al di fuori della serie accettabile di dati relativi ai controlli negativi o dei dati relativi ai controlli negativi storici del laboratorio (19).

44. In rari casi, anche dopo ulteriori analisi, quando la serie di dati non consente di valutare i risultati come positivi o negativi, i risultati sono dichiarati equivoci.

45. Un aumento del numero di cellule poliploidi può significare che la sostanza chimica in esame è potenzialmente in grado di inibire processi mitotici e di indurre aberrazioni numeriche nei cromosomi (20). Un aumento del numero di cellule con cromosomi demoltiplicatore può indicare che la sostanza chimica in esame è potenzialmente in grado di inibire la progressione del ciclo cellulare (21) (22), che è un meccanismo diverso dall'inibizione dei processi mitotici per indurre cambiamenti numerici dei cromosomi (cfr. il paragrafo 2). Pertanto, l'incidenza delle cellule poliploidi e quella delle cellule con cromosomi demoltiplicatore devono essere registrate separatamente.

Relazione sull'esecuzione della prova

46. I seguenti dati devono figurare nella relazione sull'esecuzione della prova.

Sintesi

Sostanza chimica in esame:

— origine, numero di lotto e data di scadenza, se disponibile;

— stabilità della sostanza chimica in esame, se nota.

— solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente, se note;

— misurazione del pH, dell'osmolalità e del precipitato nel terreno di coltura al quale è stata aggiunta la sostanza chimica in esame, se del caso.

Sostanza monocostituente:

— aspetto fisico, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche;

— identificazione chimica, come la denominazione IUPAC o CAS, il numero CAS, il codice SMILES o InChI, la formula strutturale, l'identità chimica o impurezze, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc.

Sostanza multicostituente, UVCB e miscele:

— caratterizzata nella massima misura possibile con l'identità chimica (cfr. sopra), con la presenza quantitativa e con le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti.

Preparazione della sostanza chimica in esame:

— motivazione della scelta del mezzo disperdente;

— solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/mezzo disperdente.

— preparazione dei preparati per somministrazione per via alimentare, con l'acqua da bere o per inalazione;

— determinazione analitica dei preparati (ad esempio, stabilità, omogeneità, concentrazioni nominali) se effettuata.

Animali utilizzati nella prova:

— specie/ceppi usati e giustificazione della scelta;

— numero ed età degli animali;

— origine, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.;

— metodo di identificazione univoca degli animali

— per gli studi a breve termine: peso di ciascun animale all'inizio e alla fine della prova; per gli studi di durata superiore a una settimana: peso di ciascun individuo durante lo studio e consumo di cibo. Devono essere inclusi l'intervallo, la media e la deviazione standard per ciascun gruppo.

Condizioni sperimentali:

— dati sui controlli positivi e negativi (mezzo disperdente/solvente);

— dati della prova per determinare l'intervallo delle dosi, se effettuato;

— criteri di selezione delle dosi;

— criteri di selezione della via di somministrazione;

— dettagli della preparazione della sostanza in esame;

— modalità precise di somministrazione della sostanza chimica in esame;

— criteri di determinazione del momento della soppressione incruenta;

— metodi di misurazione della tossicità animale, compresi, se disponibili, analisi istopatologiche o ematologiche e la frequenza con cui è stato misurato il peso corporeo e sono state realizzate osservazioni sugli animali;

— metodi atti a verificare che la sostanza in esame ha raggiunto il tessuto bersaglio o la circolazione sanguigna, se i risultati sono negativi;

— dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno) calcolata in funzione della concentrazione (ppm) della sostanza chimica in esame contenuta nella dieta/acqua da bere e del consumo, se del caso;

— dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua;

— descrizione dettagliata dello schema di trattamento e di campionamento e giustificazione delle scelte;

— metodo di soppressione incruenta degli animali;

— metodo di analgesia (se usato)

— procedure per isolare i tessuti;

— natura e concentrazione dell'inibitore della metafase, durata di esposizione del trattamento;

— metodi di preparazione dei vetrini;

— criteri di conteggio delle aberrazioni;

— numero di cellule analizzate per animale;

— criteri in base ai quali i risultati sono considerati positivi, negativi o ambigui.

Risultati:

— condizioni dell'animale prima e durante il periodo di saggio, compresi i segni di tossicità;

— peso corporeo e degli organi al momento della soppressione incruenta (in caso di trattamenti multipli, pesi corporei registrati durante il regime di trattamento);

— segni di tossicità;

— indice mitotico;

— rapporto fra le cellule degli spermatogoni in mitosi e le cellule che si trovano nella prima e seconda metafase meiotica, o altra risposta dell'esposizione al tessuto bersaglio;

— tipo e numero di aberrazioni, indicati separatamente per ciascun animale;

— numero totale delle aberrazioni per gruppo, con medie e deviazioni standard;

— numero di cellule che presentano aberrazioni per gruppo, con medie e deviazioni standard;

— relazione dose-risposta, ove possibile;

— analisi e metodi statistici applicati;

— dati sui controlli negativi concomitanti;

— dati sui controlli negativi storici, con intervalli, medie e deviazioni standard nonché intervallo di confidenza del 95 % (se disponibile) o dati pubblicati sui controlli negativi storici usati per l'accettabilità dei risultati della prova;

— dati sui controlli positivi concomitanti;

— eventuali cambiamenti di aploidia, comprese le frequenze di poliploidi e/o delle cellule demoltiplicatore;

Discussione dei risultati

Conclusione

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris

(2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

(3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.

(4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.

(5) Hess, R.A. and de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 1-15.

(6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379.Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. and Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.

(7) Cattanach, B.M., and Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.

(8) Cattanach, B.M., and Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.

(9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.

(10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313–324.

(11) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19–30.

(12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.

(13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207-209.

(15) Hsu, T.C., Elder, F. and Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. Environ. Mutagen., 1, 291-294.

(16) Evans, E.P., Breckon, G., and Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.

(17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G.and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

(19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. Mutation Res., 723, 87-90.

(20) Warr T.J., Parry E.M. and Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, Mutation Res., 287, 29-46.

(21) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. Cancer Res., 43, 1362-1364.

(22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. Mutation Res., 119, 403-413.

Appendice

DEFINIZIONI

Aneuploidia: qualsiasi deviazione dal normale numero diploide (o aploide) di cromosomi da parte di uno o più cromosomi, ma non dell'intero corredo di cromosomi (poliploidi).

Centromero: regione/i di un cromosoma cui si attaccano le del fuso durante la divisione cellulare, permettendo il corretto movimento dei cromosomi figli verso i poli delle cellule figlie.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Diversità dei cromosomi: diversità delle forme (ad esempio metacentrici, acro centrici, ecc.) e delle dimensioni dei cromosomi.

Aberrazione di tipo cromatidico: alterazione cromosomica strutturale che si manifesta nella rottura di un singolo cromati dio o nella rottura e ricongiunzione di cromatisi.

Aberrazione di tipo cromosomico: alterazione cromosomica strutturale che si manifesta nella rottura, o nella rottura e ricongiunzione, di entrambi i cromatisi in uno stesso punto.

Clastogeno: qualsiasi sostanza chimica che causa aberrazioni cromosomiche strutturali in popolazioni di cellule o organismi.

Gap: lesione acromatica di ampiezza inferiore a un cromatine, con minimo disallinea mento dei cromatisi.

Genotossico: termine generico che comprende tutti i tipi di danno a carico del DNA o dei cromosomi, tra cui rotture, cancellazioni, addotti, alterazioni e collegamenti nucleotidi, ridispacciamento, mutazioni, aberrazioni cromosomiche e annexi_and_ia. Non tutti i tipi di effetti genotossici determinano alterazioni cromosomiche o danni permanenti ai cromosomi.

Indice mitotico (MI): rapporto tra le cellule in metafase diviso per il numero totale di cellule osservate in una popolazione cellulare: costituisce un'indicazione del grado di proliferazione della popolazione cellulare.

Mitosi: divisione del nucleo cellulare, solitamente suddivisa in profase, pro metafase, metafase, analysis e telofase.

Mutageno: un fattore in grado di provocare mutazioni ereditarie della o delle sequenze di coppie di basi del DNA nei geni o della struttura dei cromosomi (aberrazioni cromosomiche).

Aberrazione numerica: variazione del numero di cromosomi rispetto al numero diploide caratteristico della specie.

Poliploidi: un multiplo del numero di cromosomi aploidi (*n*) diverso dal numero diploide (ossia 3*n*, 4*n* ecc.).

Aberrazione strutturale: alterazione della struttura cromosomica visibile all'esame microscopico dello stadio di metafase della divisione cellulare, che si presenta con dilezione e alterazioni di segmenti, scambi.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata applicando il presente metodo di prova.

UVCB: sostanze di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali biologici."

5) Nella parte B, il capitolo B.40 è sostituito dal seguente:

"B.40 **CORROSIONE CUTANEA IN VITRO: METODO DI PROVA DELLA RESISTENZA ELETTRICA TRANSCUTANEA (TER)**

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 430 (2015). Per corrosione cutanea si intende la manifestazione di lesioni irreversibili della pelle in forma di necrosi visibile dell'epidermide e del derma, a seguito dell'applicazione della sostanza chimica in esame [secondo la definizione del Sistema globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (UN GHS) (1) e del regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele (CLP) ([1])]. Il presente metodo di prova B.40 aggiornato propone una procedura *in vitro* che consente di individuare le sostanze e le miscele non corrosive e corrosive conformemente al GHS dell'ONU (1) e al regolamento CLP.

2. Tradizionalmente, la valutazione della corrosività cutanea è effettuata su animali da esperimento (TM B.4 equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 404 originariamente adottata nel 1981 e rivista nel 1992, nel 2002 e nel 2015) (2). Oltre al presente metodo di prova B.40 sono stati validati e adottati altri metodi di prova *in vitro* per determinare la corrosività cutanea potenziale di sostanze chimiche, come ad esempio il metodo di prova B.40 *bis* (equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 431) (3) e il metodo di prova B.65 (equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 435) (4), anch'essi in grado di individuare sottocategorie di sostanze chimiche corrosive laddove richiesto. Diversi metodi di prova *in vitro* validati sono stati adottati, ad esempio il metodo di prova B.46 [equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 439 (5)], al fine di essere utilizzati per determinare l'irritazione cutanea. Un documento di orientamento dell'OCSE relativo agli approcci integrati in materia di prove e valutazioni (IATA – *Integrated Approaches to Testing and Assessment*) per la corrosione e l'irritazione cutanea descrive diversi moduli che raggruppano una serie di fonti di informazione e strumenti di analisi e i) fornisce orientamenti su come integrare e utilizzare i dati sperimentali e non sperimentali esistenti per valutare il potenziale di irritazione cutanea e di corrosione cutanea delle sostanze chimiche e ii) propone un approccio quando occorrono prove ulteriori (6).

3. Il presente metodo di prova riguarda l'endpoint per la salute umana della corrosione cutanea. Esso si fonda sul metodo di prova della resistenza elettrica transcutanea (TER) condotto su pelle di ratto che utilizza dischi di tessuto cutaneo per individuare le sostanze corrosive grazie alla loro capacità di produrre una perdita dell'integrità dello strato corneo normale e della funzione di barriera. La linea guida dell'OCSE corrispondente è stata inizialmente adottata nel 2004 e aggiornata nel 2015 per fare riferimento al documento di orientamento IATA.

4. Per valutare le prove di corrosione cutanea *in vitro* a fini regolamentari sono stati condotti studi di prevalidazione (7), seguiti da uno studio di validazione formale del metodo di prova della TER su pelle di ratto per valutare la corrosione cutanea (8) (9) (10) (11). I risultati di questi studi hanno permesso di stabilire che il metodo di prova della TER (denominato metodo di riferimento validato o VRM) può essere utilizzato a fini regolamentari per valutare la corrosività cutanea *in vivo* (12) (13) (14).

5. Prima di poter utilizzare a fini regolamentari un metodo di prova della TER *in vitro* per la corrosione cutanea, simile o modificato, diverso dal VRM, occorre determinarne l'affidabilità, la pertinenza (accuratezza) e i limiti per l'uso proposto al fine di assicurare che sia simile al VRM, conformemente ai requisiti degli standard di prestazione (15). Il quadro del sistema dell'OCSE di reciproca accettazione dei dati sarà garantito solo una volta che i metodi di prova proposti, nuovi o aggiornati, conformi agli standard di prestazione sono stati esaminati e integrati nella corrispondente linea guida dell'OCSE.

DEFINIZIONI

6. Le definizioni usate sono riportate nell'appendice.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

7. I risultati di uno studio di validazione (10) e di altri studi pubblicati (16) (17) indicano che il metodo di prova della TER condotto su pelle di ratto permette di distinguere, tra le sostanze conosciute, quelle che sono corrosive e non corrosive per la pelle con una sensibilità complessiva del 94 % (51/54) e una specificità del 71 % (48/68) in una banca dati di 122 sostanze.

([1]) Regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2008, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006 (GU L 353 del 31.12.2008, pag. 1).

8. Il presente metodo di prova riguarda la corrosione cutanea *in vitro*. Esso permette di individuare le sostanze chimiche non corrosive e corrosive in esame in conformità al GHS delle Nazioni Unite e al regolamento CLP. Un limite del presente metodo di prova, dimostrato dagli studi di validazione (8) (9) (10) (11), è che non permette la sottocategorizzazione delle sostanze e delle miscele corrosive conformemente al GHS delle Nazioni Unite e al regolamento CLP. Il quadro normativo applicabile stabilirà in che modo il presente metodo di prova sarà utilizzato. Se da un lato il presente metodo di prova non fornisce informazioni adeguate sull'irritazione cutanea, è opportuno notare che il metodo B.46 riguarda in modo specifico le prove d'irritazione cutanea *in vitro* e gli effetti sulla salute (5). Per una valutazione completa degli effetti cutanei locali dopo una singola esposizione della pelle, si raccomanda di consultare il documento di orientamento dell'OCSE relativo agli IATA (6).

9. Nella validazione del metodo in questione è stata sottoposta a prova un'ampia gamma di prodotti chimici, rappresentanti principalmente sostanze, e la banca dati empirica dello studio di validazione contava 60 sostanze appartenenti a una vasta gamma di classi di sostanze chimiche (9). I dati generali disponibili indicano che il metodo di prova è applicabile a un'ampia gamma di classi di sostanze chimiche e stati fisici, inclusi liquidi, semisolidi, solidi e cere. Tuttavia, poiché per specifici stati fisici non sono facilmente disponibili sostanze in esame con dati di riferimento adeguati, va notato che durante la validazione è stato valutato un numero relativamente ridotto di cere e solidi corrosivi. I liquidi possono essere acquosi o non acquosi, i solidi possono essere solubili o insolubili in acqua. Il metodo di prova non deve essere utilizzato con una categoria specifica di sostanze qualora possa essere dimostrata la sua non applicabilità a tale categoria specifica. Inoltre, si presume che il metodo di prova sia applicabile alle miscele oltre che alle sostanze. Tuttavia, poiché le miscele coprono un ampio spettro di categorie e composizioni e tenuto conto delle informazioni limitate attualmente disponibili circa la sperimentazione sulle miscele, nei casi in cui sia possibile dimostrare che il metodo di prova non è applicabile a una categoria specifica di miscele (ad esempio applicando una strategia come proposto da Eskes *et al.*, 2012) (18) è opportuno evitare di utilizzare il metodo di prova per tale categoria specifica di sostanze. Prima di applicare il presente metodo di prova a una miscela per generare dati ai fini regolamentari previsti, si deve considerare se, e in caso affermativo perché, esso possa fornire risultati adeguati a tale scopo. Tali considerazioni non sono necessarie laddove esista una disposizione normativa che obblighi a sottoporre a prova la miscela. I gas e gli aerosol non sono ancora stati valutati nell'ambito di studi di validazione (8) (9). Benché sia ipotizzabile che essi possano essere testati utilizzando il metodo di prova della TER, l'attuale metodo di prova non prevede l'esecuzione di prove per gas e aerosol.

PRINCIPIO DELLA PROVA

10. La sostanza chimica in esame è applicata per non più di 24 ore sulla superficie epidermica di dischi di tessuto cutaneo in un sistema di test a due compartimenti nel quale i dischi di tessuto cutaneo fungono da separatori tra i compartimenti. I dischi di tessuto cutaneo sono prelevati da ratti di 28-30 giorni, soppressi con metodi non cruenti. Le sostanze chimiche corrosive sono individuate in base alla loro capacità di comportare una perdita dell'integrità dello strato corneo normale e della funzione di barriera, che si misura come riduzione della TER al di sotto di un livello soglia (16) (cfr. il paragrafo 32). Per la TER su pelle di ratto, un valore limite di 5 kΩ è stato scelto sulla base di molti dati relativi ad un elevato numero di sostanze per le quali la maggior parte dei valori era nettamente superiore (spesso > 10 kΩ), o nettamente inferiore (spesso < 3 kΩ) a tale valore (16). In generale, le sostanze chimiche in esame che sono non corrosive per gli animali ma che sono irritanti o non irritanti non comportano una riduzione della TER al di sotto di tale valore limite. Inoltre, l'utilizzo di altre preparazioni cutanee o di altre attrezzature può alterare il valore limite, rendendo necessaria in tal caso una validazione supplementare.

11. La procedura sperimentale include una sequenza relativa alla fissazione del colorante al fine di confermare i risultati positivi del TER con valori attorno a 5 kΩ. Tale sequenza determina se l'aumento della permeabilità ionica è dovuto alla distruzione fisica dello strato corneo. È stato dimostrato che il metodo della TER su pelle di ratto permetteva di predire la corrosività *in vivo* nel coniglio valutata con il metodo di prova B.4 (2).

DIMOSTRAZIONE DELLA COMPETENZA DI LABORATORIO

12. Prima di utilizzare sistematicamente il metodo di prova della TER su pelle di ratto conforme al presente metodo di prova, i laboratori dimostrano la loro competenza tecnica classificando correttamente le dodici sostanze chimiche per la verifica della competenza tecnica raccomandate nella tabella 1. Nel caso in cui una sostanza in elenco non sia disponibile o nel caso in cui sia giustificato, può essere utilizzata un'altra sostanza per la quale sono disponibili dati di riferimento *in vivo* e *in vitro* (ad esempio scegliendo dalla lista delle sostanze chimiche di riferimento (16)) a condizione che siano applicati i medesimi criteri di selezione di cui alla tabella 1.

Tabella 1

elenco delle sostanze di prova a fini di competenza [1]

Sostanza	n. CAS	Classe chimica [2]	Cat. UN GHS/CLP sulla base dei risultati *in vivo* [3]	Cat. VRM sulla base dei risultati in vitro	Stato fisico	pH [4]
Sostanze corrosive *in vivo*						
N,N'-dimetil dipropilenetriamina	10563-29-8	base organica	1A	6 × C	L	8,3
1,2-diaminopropano	78-90-0	base organica	1A	6 × C	L	8,3
acido solforico (10 %)	7664-93-9	acido inorganico	(1A/)1B/1C	5 × C 1 × NC	L	1,2
idrossido di potassio (10 % acq.)	1310-58-3	base inorganica	(1A/)1B/1C	6 × C	L	13,2
acido ottanoico (caprilico)	124-07-2	acido organico	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,6
2-terzbutilfenolo	88-18-6	fenolo	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,9
Sostanze non corrosive *in vivo*						
acido isostearico	2724-58-5	acido organico	NC	6 × NC	L	3,6
4-amino-1,2,4-triazolo	584-13-4	base organica	NC	6 × NC	S	5,5
fenetil bromuro	103-63-9	elettrofilo	NC	6 × NC	L	3,6
4-(metiltio)-benzaldeide	3446-89-7	elettrofilo	NC	6 × NC	L	6,8
1,9-decadiene	1647-16-1	sostanza organica neutra	NC	6 × NC	L	3,9
tetracloroetilene	127-18-4	sostanza organica neutra	NC	6 × NC	L	4,5

Abbreviazioni: acq. = acquoso; n. CAS = numero di registrazione CAS (*Chemical Abstracts Service Registry Number*); VRM = metodo di riferimento validato; C = corrosivo; NC = non corrosivo.

(1) Le sostanze di prova a fini di competenza, classificate dapprima come corrosive o non corrosive, poi per sottocategoria di sostanze corrosive e poi per classe chimica, sono state selezionate tra le sostanze utilizzate nello studio di validazione dell'ECVAM per il metodo di prova della TER su pelle di ratto (8) (9). Salvo indicazione contraria, le sostanze sono state sottoposte a prova al livello di purezza ottenuto per le sostanze provenienti dal mercato (8). Nella misura del possibile, nella selezione sono state incluse sostanze che: i) sono rappresentative dello spettro di reazioni di corrosività (ad esempio non corrosive, da poco a fortemente corrosive) che il VRM può misurare o prevedere; ii) sono rappresentative delle classi chimiche usate nello studio di validazione; iii) rispecchiano le caratteristiche di esecuzione del VRM; iv) hanno strutture chimiche ben definite; v) permettono di ottenere risultati definitivi con il metodo di prova di riferimento *in vivo*; vi) sono disponibili sul mercato; e vii) non comportano costi di smaltimento proibitivi.

(2) Classe chimica assegnata da Barratt *et al.* (8).

(3) I gruppi di imballaggio delle Nazioni Unite I, II e III corrispondono rispettivamente alle categorie 1A, 1B e 1C del GHS delle Nazioni Unite/regolamento CLP.

(4) I valori del pH sono stati ottenuti da Fentem *et al.* (9) e da Barratt *et al.* (8).

PROCEDURA

13. Esistono procedure operative standard per il metodo di prova della TER su pelle di ratto per valutare la corrosione cutanea (19). I metodi di prova della TER su pelle di ratto che rientrano in tale metodo di prova sono conformi alle seguenti condizioni:

Animali

14. È opportuno l'utilizzo di ratti in quanto la sensibilità della loro pelle alle sostanze utilizzate in questo metodo di prova è stata già dimostrata (12) e si tratta dell'unica fonte di pelle formalmente validata (8) (9). L'età (al momento in cui la pelle è prelevata) e il ceppo del ratto sono particolarmente importanti perché si deve essere sicuri che i follicoli piliferi siano in fase d'inattività, prima dell'inizio della crescita dei peli adulti.

15. I peli della zona dorsale e laterale di giovani ratti maschi o femmine di circa 22 giorni (Wistar o ceppo comparabile) sono rimossi con cura per mezzo di piccole forbici. Gli animali sono successivamente lavati con cura mediante pezze bagnate e la zona rimossa è immersa in una soluzione antibiotica (contenente, ad esempio, streptomicina, penicillina, cloramfenicolo e amfotericina a concentrazioni efficaci per inibire la crescita batterica). Gli animali sono nuovamente lavati con antibiotici il terzo o il quarto giorno dopo il primo lavaggio e sottoposti al test entro 3 giorni dal secondo lavaggio, quando lo strato corneo si è rimesso dalla rimozione dei peli.

Preparazione dei dischi di tessuto cutaneo

16. Gli animali sono soppressi in modo non cruento quando hanno 28-30 giorni (l'età riveste un'importanza particolare). La pelle dorso-laterale di ciascun animale è successivamente rimossa ed accuratamente liberata da qualsiasi eccesso di grasso sottocutaneo. Vengono rimossi dischi di tessuto cutaneo del diametro di circa 20 mm. Il tessuto cutaneo potrà essere conservato prima dell'utilizzo dei dischi se i dati dei controlli positivi e negativi risultano equivalenti a quelli ottenuti sul tessuto cutaneo fresco.

17. Ciascun disco di tessuto cutaneo è posto su una delle estremità di un tubo di politetrafluoroetilene (PTFE), con la superficie epidermica a contatto con il tubo. Dopo aver fissato il disco all'estremità del tubo con un anello di tenuta toroidale in gomma, si elimina la parte eccedentaria del tessuto. L'anello toroidale di gomma viene quindi fissato con cura all'estremità del tubo per mezzo di vaselina. Il tubo è posizionato con una pinza a molla all'interno in un cilindro contenente una soluzione di 154 mM di $MgSO_4$ (figura 1). Il disco cutaneo deve essere interamente sommerso nella soluzione di $MgSO_4$. È possibile ottenere fino a 10-15 dischi di tessuto cutaneo dalla pelle di un solo ratto. Le dimensioni del tubo e del giunto toroidale sono indicate nella figura 2.

18. Prima di cominciare la sperimentazione, misurare la resistenza elettrica di due dischi cutanei per controllare la qualità della pelle di ciascun animale. I due dischi devono dare valori di resistenza elettrica superiori a 10 kΩ affinché gli altri dischi possano essere utilizzati per il metodo di prova. Se il valore di resistenza è inferiore a 10 kΩ, gli altri dischi della stessa pelle devono essere eliminati.

Applicazione della sostanza chimica in esame e delle sostanze di controllo

19. Controlli positivi e negativi concorrenti devono essere utilizzati per ciascuna batteria di prove (esperimento) in modo da garantire un'adeguata esecuzione del modello sperimentale. Per ciascuna batteria di prove (esperimento) devono essere utilizzati dischi di tessuto cutaneo provenienti da un unico animale. Le sostanze chimiche proposte per i controlli positivi e negativi sono, rispettivamente, l'acido cloridrico 10 M e l'acqua distillata.

20. La sostanza chimica liquida in esame (150 µl) è applicata uniformemente sulla superficie epidermica all'interno del tubo. Per il test di sostanze solide, si applica in modo uniforme sul disco di tessuto cutaneo una quantità sufficiente di sostanza in modo da coprire la totalità della superficie dell'epidermide. Dopo avere aggiunto l'acqua deionizzata (150 µl) sulla sostanza solida, agitare delicatamente il tubo. Per ottenere il massimo contatto con la pelle può risultare necessario riscaldare i solidi a 30 °C per sciogliere o rammollire la sostanza chimica in esame o macinarli per ottenere grani o polveri.

21. In ogni batteria di prove (esperimento), sono utilizzati tre dischi di tessuto cutaneo per ciascuna sostanza chimica di prova e di controllo. La sostanza chimica in esame è applicata per 24 ore a 20-23 °C, quindi rimossa con un getto d'acqua corrente a temperatura ambiente fino alla sua completa rimozione.

Misurazione della TER

22. L'impedenza cutanea è determinata misurando la TER per mezzo di un ponte Wheatstone a basso voltaggio e corrente alternata (18). Le specificazioni generali del ponte sono una tensione operativa di 1-3 V, una corrente alternata sinusoidale o rettangolare di 50-1 000 Hz ed un intervallo di misurazione di almeno 0,1-30 kΩ. Il ponte utilizzato nello studio di validazione misura l'induttanza, la capacitanza e la resistenza fino a valori di 2 000 H, 2 000 μF e 2 MΩ, rispettivamente, a frequenze di 100 Hz o 1 kHz, utilizzando valori in serie o paralleli. Ai fini della TER, le misurazioni delle prove di corrosività sono registrate in resistenza ad una frequenza di 100 Hz utilizzando valori in serie. Prima di misurare la resistenza elettrica, la tensione di superficie della pelle è ridotta aggiungendo un volume di etanolo al 70 % sufficiente a coprire l'epidermide. Dopo alcuni secondi, l'etanolo è rimosso dal tubo e il tessuto è idratato con l'aggiunta di 3 ml di soluzione di $MgSO_4$ (154 mM). Gli elettrodi del ponte di misurazione sono posizionati su entrambi i lati del disco di tessuto cutaneo per misurare la resistenza in kΩ/disco di tessuto cutaneo (figura 1). Le dimensioni degli elettrodi e la lunghezza dell'elettrodo esposto al di sotto dei morsetti a coccodrillo sono indicate nella figura 2. Il morsetto attaccato all'elettrodo interno è posto sulla parte superiore del tubo durante la misurazione della resistenza, affinché la lunghezza dell'elettrodo immerso nella soluzione di $MgSO_4$ resti costante. L'elettrodo esterno è posizionato all'interno del cilindro in modo tale da posarsi sul fondo dello stesso. La distanza tra la pinza a molla e la parte inferiore del tubo deve rimanere costante (figura 2), poiché tale distanza influenza il valore di resistenza che si ottiene. Di conseguenza, la distanza tra l'elettrodo interno e il disco di tessuto cutaneo deve essere costante e minima (1-2 mm).

23. Se la misurazione della resistenza dà un valore superiore a 20 kΩ, ciò può essere dovuto ad un residuo della sostanza chimica in esame che copre la superficie epidermica del disco di tessuto cutaneo. Un tentativo di rimozione della sostanza può essere effettuato, ad esempio, turando ermeticamente il tubo con il pollice inguantato ed agitandolo per 10 secondi circa; la soluzione di $MgSO_4$ viene così completamente rimossa e la misurazione della resistenza è ripetuta con una nuova soluzione di $MgSO_4$.

24. Le proprietà e le dimensioni dell'apparecchiatura e la procedura sperimentale utilizzate possono influenzare i valori della TER che si ottengono. La soglia di corrosività è stata fissata a 5 kΩ sulla base di dati ottenuti con l'apparecchiatura e la procedura sperimentale specifiche descritte nel presente metodo di prova. Possono essere applicati diversi valori limite e di controllo nel caso in cui le condizioni sperimentali siano alterate o sia utilizzata una diversa attrezzatura. Pertanto, si raccomanda di calibrare la metodologia ed i valori limite di resistenza testando una serie di sostanze da utilizzare per stabilire la competenza scelte fra le sostanze utilizzate nello studio di validazione (8) (9) o fra classi di sostanze chimiche simili a quelle studiate. Un elenco di idonee sostanze di prova a fini di competenza è proposto nella tabella 1.

Metodi di fissazione del colorante

25. L'esposizione ad alcune sostanze non corrosive può comportare una diminuzione della resistenza al di sotto del valore soglia di 5 kΩ e permettere il passaggio di ioni attraverso lo strato corneo riducendo in tal modo la resistenza elettrica (9). Ad esempio, le sostanze organiche neutre e le sostanze tensioattive (compresi detergenti, emulsionanti ed altri agenti di superficie) possono eliminare i lipidi della pelle rendendo in tal modo la barriera più permeabile agli ioni. Di conseguenza, se i valori della TER prodotti da tali sostanze chimiche sono inferiori o vicini a 5 kΩ, in mancanza di lesioni percepibili si deve effettuare una valutazione della penetrazione del colorante sui tessuti di controllo e sui tessuti trattati per determinare se i valori della TER ottenuti sono il risultato della maggiore permeabilità della pelle o della corrosione cutanea (7) (9). In caso di corrosione cutanea con danno dello strato corneo, il colorante sulforodamina B, quando applicato sulla pelle, penetra rapidamente e colora il tessuto sottostante. Questo colorante è stabile con un'ampia gamma di sostanze e non è influenzato dal procedimento di estrazione descritto di seguito.

Applicazione ed eliminazione del colorante sulforodamina B

26. Al termine della valutazione della TER, il solfato di magnesio è rimosso dal tubo ed il tessuto cutaneo è esaminato con cura in cerca di lesioni manifeste. Se non ci sono importanti lesioni manifeste (ad esempio perforazione), 150 μl di una diluizione al 10 % (p/v) di colorante sulforodamina B (rosso acido 52; C.I. 45100; n. CAS 3520-42-1) in acqua distillata sono applicati sulla superficie epidermica di ogni disco di tessuto cutaneo per 2 ore. Questi dischi di tessuto cutaneo vengono successivamente lavati con un getto d'acqua corrente a temperatura ambiente per circa 10 secondi in modo da eliminare il colorante eccedentario/non fissato. Ciascun disco di tessuto cutaneo è rimosso attentamente dal tubo e messo in una fiala (ad esempio, una fiala a scintillazione in vetro da 20 ml) contenente acqua deionizzata (8 ml). Le fiale sono agitate delicatamente per 5 minuti fino ad eliminare qualsiasi eccesso di colorante non fissato. Dopo aver ripetuto la procedura di

risciacquo, i dischi di tessuto cutaneo sono rimossi e inseriti in fiale contenenti 5 ml di sodio dodecil solfato (SDS) al 30 % (p/v) in acqua distillata, quindi incubati per una notte a 60 °C.

27. In seguito all'incubazione, ciascun disco di tessuto cutaneo è rimosso e scartato e la soluzione restante è centrifugata per 8 minuti a 21 °C (forza centrifuga relativa ~175 × g). Un campione di 1 ml di supernatante è in seguito diluito in rapporto 1:5 (v/v) (cioè 1 ml + 4 ml) con SDS al 30 % (p/v) in acqua distillata. La densità ottica (OD) della soluzione è misurata a 565 nm.

Calcolo del tasso di colorante

28. Il tasso di sulforodamina B in ciascun disco è calcolato sulla base dei valori di OD (9) (coefficiente di estinzione molare della sulforodamina B a 565 nm = 8,7 × $l0^4$; peso molecolare = 580). Il tenore di colorante è determinato per ciascun disco di tessuto cutaneo per mezzo di un'idonea curva di taratura. Un tenore medio è quindi calcolato per le repliche.

Criteri di accettabilità

29. I valori medi della TER sono accettati se i valori dei controlli positivi e negativi effettuati in parallelo si situano entro gli intervalli accettabili di valori per il metodo utilizzato nel laboratorio di prova. Gli intervalli accettabili di resistenza per la metodologia e l'apparecchiatura descritte sono indicati nella tabella seguente:

Controllo	Sostanza	Intervallo di resistenza (kΩ)
Positivo	10 M acido cloridrico	0,5-1,0
Negativo	Acqua distillata	10-25

30. I valori medi della fissazione del colorante sono accettati a condizione che i valori dei controlli effettuati in parallelo si situino entro gli intervalli accettabili per il metodo. Gli intervalli accettabili di tasso colorante per le sostanze di controllo proposte per la metodologia e l'apparecchiatura descritte sono i seguenti:

Controllo	Sostanza	Intervallo di tasso di colorante (μg/disco)
Positivo	10 M acido cloridrico	40-100
Negativo	Acqua distillata	15-35

Interpretazione dei risultati

31. Il valore limite della TER che discrimina le sostanze chimiche in esame corrosive da quelle non corrosive è stato stabilito nel corso dell'ottimizzazione del metodo di prova, testato in una fase di prevalidazione e confermato in uno studio formale di validazione.

32. Di seguito è descritto il modello predittivo per il metodo di prova della TER su pelle di ratto per valutare la corrosione cutanea (9) (19), associato al sistema di classificazione del GHS delle Nazioni Unite/regolamento CLP.

La sostanza chimica in esame è considerata non corrosiva per la pelle:

i) se il valore medio della TER ottenuto per la sostanza chimica in esame è superiore a (>) 5 kΩ; o

ii) se il valore medio della TER ottenuto per la sostanza chimica in esame è inferiore o uguale a (≤) 5 kΩ; e

— il disco di tessuto cutaneo non presenta alcuna lesione manifesta (ad esempio perforazione), e

— il tasso medio di colorante del disco è inferiore (<) a quello del disco di controllo positivo di 10 M HCl realizzato in parallelo (cfr. il paragrafo 30 per i valori di controllo positivi).

La sostanza chimica in esame è considerata corrosiva per la pelle:

i) se il valore medio della TER ottenuto per la sostanza chimica in esame è inferiore o uguale a (≤) 5 kΩ e se il disco di tessuto cutaneo presenta lesioni manifeste (ad esempio perforazione); o

ii) se il valore medio della TER ottenuto per la sostanza chimica in esame è inferiore o uguale a (≤) 5 kΩ; e

— il disco di tessuto cutaneo non presenta alcuna lesione manifesta (ad esempio perforazione), ma

— il tasso medio di colorante del disco è superiore o uguale (≥) a quello del disco di controllo positivo di 10 M HCl realizzato in parallelo (cfr. il paragrafo 30 per i valori di controllo positivi).

33. Una batteria di prove (esperimento) costituito da almeno tre dischi di tessuto cutaneo di replica dovrebbe essere sufficiente per una sostanza chimica in esame, se la classificazione è univoca. Tuttavia, in caso di risultati inconclusivi, tra cui misurazioni discordanti delle repliche e/o una TER media pari a 5 ± 0,5 kΩ, si dovrebbe considerare l'opportunità di eseguire una seconda batteria di prove (esperimento) indipendente, oltre che una terza nell'eventualità di risultati discordanti tra le prime due.

DATI E RELAZIONE

Dati

34. I valori di resistenza (kΩ) e, eventualmente, i valori di tasso medio del colorante (μg/disc) per la sostanza chimica in esame e per i controlli positivi e negativi devono essere presentati sotto forma di tabella e includere i dati di ciascun disco di replica in ogni batteria di prove (esperimento) nonché i valori medi ± SD. Sono riportati tutti gli esperimenti ripetuti. Per ogni sostanza chimica in esame sono riportate le lesioni osservate sui dischi di tessuto cutaneo.

Relazione sull'esecuzione della prova

35. La relazione sull'esecuzione della prova deve comprendere le seguenti informazioni.

Sostanze chimiche in esame e sostanze di controllo:

— sostanza monocostituente: dati di identificazione chimica, come denominazioni IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula strutturale, purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc.;

— sostanza multicostituente, UVCB o miscela: caratterizzate nella massima misura possibile con l'identità chimica (cfr. sopra), con la presenza quantitativa e con le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti;

— aspetto fisico, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche;

— origine, numero del lotto se disponibile;

— trattamento delle sostanze chimiche in esame/sostanze di controllo prima della prova, se applicabile (ad esempio, riscaldamento, frantumazione);

— stabilità della sostanza chimica in esame, data limite di utilizzo, data della nuova analisi, se nota;

— condizioni di conservazione.

Animali utilizzati nella prova:

— ceppo e sesso utilizzati,

— età degli animali in caso d'utilizzo come animali donatori;

— origine, condizioni di alloggio, dieta, ecc.;

— dettagli sulla preparazione della pelle.

Condizioni sperimentali:

— curve di taratura dell'apparecchiatura di test,

— curve di taratura dell'esecuzione del test di fissazione del colorante, banda passante utilizzata per misurare i valori di densità ottica e intervallo di linearità dell'apparecchio di misurazione (ad esempio spettrofotometro), se del caso;

— dettagli sulla procedura sperimentale utilizzata per le misurazioni della TER,

— dettagli sulla procedura sperimentale utilizzata per la valutazione della fissazione del colorante, se del caso,

— dosi sperimentali utilizzate, durata del o dei periodi di esposizione e temperatura/temperature di esposizione;

— dettagli sulla procedura di lavaggio utilizzata dopo il periodo di esposizione;

— numero dei dischi di tessuto cutaneo di replica utilizzati per sostanza chimica in esame e per sostanza di controllo (positivo e negativo);

— descrizione di qualsiasi modifica del protocollo sperimentale;

— riferimenti a dati storici del modello. Essi dovrebbero includere (elenco non esaustivo):

i) accettabilità dei valori di controllo positivi e negativi della RET (in k) rispetto agli intervalli della resistenza dei controlli positivi e negativi;

ii) accettabilità dei valori del tasso di colorante dei controlli positivi e negativi (in µg/disc) rispetto agli intervalli del tasso di colorante dei controlli positivi e negativi;

iii) accettabilità dei risultati della prova rispetto alla variabilità storica tra i dischi di tessuto cutaneo di replica;

— descrizione dei criteri decisionali/del modello predittivo applicati.

Risultati:

— presentazione sotto forma di tabella dei dati ottenuti dalle prove della TER e della fissazione del colorante (se del caso) per ogni sostanza chimica in esame e sostanza di controllo, per ogni batteria di prove (esperimento) e ogni disco di tessuto cutaneo di replica (per ogni animale e per ogni campione di pelle), medie, deviazioni standard e coefficienti di variazione;

— descrizione di tutti gli effetti osservati;

— risultante classificazione con riferimento al modello predittivo/ai criteri decisionali utilizzati.

Discussione dei risultati

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Disponibile qui: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

(2) Capitolo B.4 del presente allegato: Irritazione/corrosione cutanea acuta.

(3) Capitolo B.40 *bis* del presente allegato: Corrosione cutanea *in vitro*: test su un modello di epidermide umana ricostituita.

(4) Capitolo B.65 del presente allegato: Metodo di prova *in vitro* su membrana-barriera per la corrosione cutanea.

(5) Capitolo B.46 del presente allegato: Irritazione cutanea *in vitro*: test su un modello di epidermide umana ricostituita

(6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.*ATLA* 23, 219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, 471-482.

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro*12, 483- 524.

(10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops.*ATLA*23, 129-147.

(11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneos Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

(14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., and Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. Fd. Chem. *Toxicol.*24, 507-512.

(17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., and Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro:* Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol. In Vitro* 6,191-194.

(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. and Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403.

(19) TER SOP (December 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.

(20) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Devlopment, Paris.

Figura 1

Attrezzatura Per La Prova Di Resistenza Elettrica Transcutanea (Ter) Su Pelle Di RattO

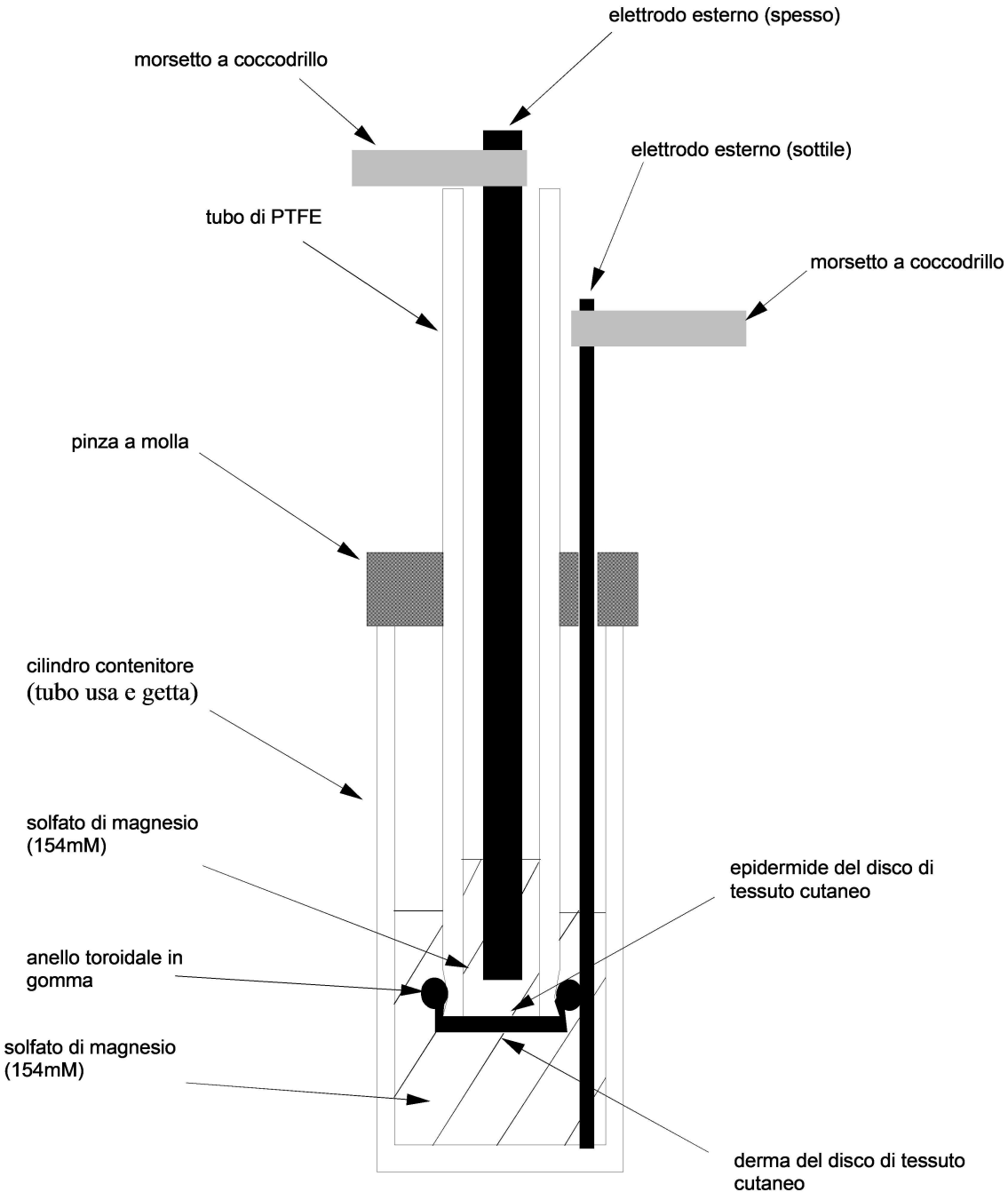
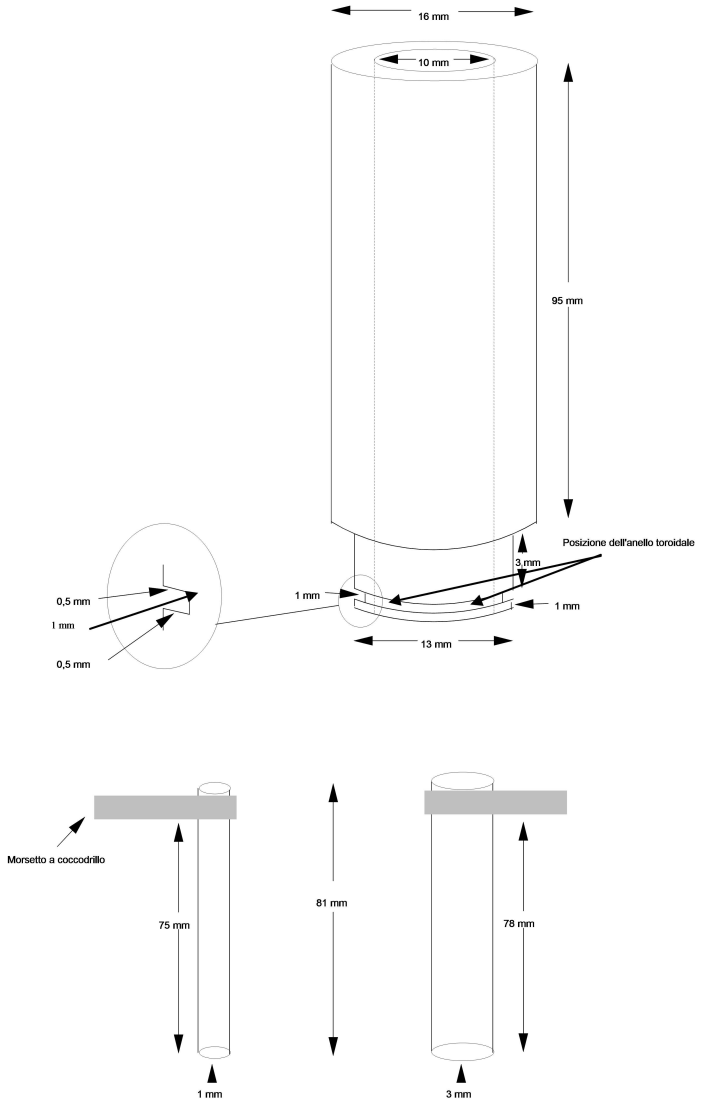


Figura 2

Dimensioni Del Tubo In Polietrafluoroetilene (Ptfe), Del Cilindro Contenitore E Degli Elettrodi Utilizzati



Fattori critici dell'attrezzatura sopra descritta:

— diametro interno del tubo PTFE,

— lunghezza degli elettrodi relativi al tubo PTFE e al cilindro contenitore: è tale che il disco di tessuto cutaneo non si trova a contatto con gli elettrodi e che una lunghezza standard dell'elettrodo si trova a contatto con la soluzione $MgSO_4$,

— quantità della soluzione $MgSO_4$ nel cilindro contenitore: la profondità del liquido, rispetto al livello nel tubo PTFE, è tale da apparire come indicato nella figura 1,

— il disco di tessuto cutaneo deve essere fissato accuratamente al tubo PTFE, di modo che la resistenza elettrica sia una misura reale delle proprietà del tessuto cutaneo.

Appendice

DEFINIZIONI

Accuratezza: grado di concordanza tra i risultati ottenuti con il metodo di prova e i valori di riferimento accettati. Misura l'efficienza del metodo di prova e costituisce un aspetto della pertinenza. Il termine è spesso utilizzato come sinonimo di "concordanza" a indicare la percentuale di risultati corretti di un metodo di prova (20).

C: corrosivo.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Concordanza: misura dell'efficacia del metodo di prova per metodi che forniscono un risultato ordinabile in categorie e rappresenta un aspetto della pertinenza. Il termine è usato come sinonimo di "accuratezza" ed è definito come la proporzione di tutte le sostanze chimiche in esame che sono correttamente classificate come positive o negative. La concordanza dipende strettamente dalla prevalenza di risultati positivi in tutti i tipi di sostanze chimiche in esame (20).

Sistema globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (UN GHS): sistema di classificazione delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) secondo tipi e livelli standardizzati di rischio fisico, sanitario e ambientale, che elabora i relativi elementi di comunicazione, quali pittogrammi, avvertenze, indicazioni di pericolo, consigli di prudenza e schede informative di sicurezza, per trasmettere informazioni sugli effetti avversi di dette sostanze a tutela delle persone (compresi datori di lavoro, lavoratori, trasportatori, consumatori e personale di pronto intervento) e dell'ambiente (1).

IATA: approcci integrati in materia di prove e valutazioni (*Integrated Approaches to Testing and Assessment*).

Miscela: una miscela o una soluzione composta di due o più sostanze.

Sostanza monocostituente: sostanza, definita attraverso la sua composizione quantitativa, in cui un costituente principale è presente in percentuale pari ad almeno l'80 % (p/p).

Sostanza multicostituente: sostanza, definita attraverso la sua composizione quantitativa, in cui più costituenti principali sono presenti in concentrazione ≥ 10 % (p/p) e < 80 % (p/p). Una sostanza multicostituente è il risultato di un processo di fabbricazione. La differenza tra miscela e sostanza multicostituente è che una miscela è ottenuta attraverso la miscelazione di due o più sostanze senza che avvenga una reazione chimica. Una sostanza multicostituente è il risultato di una reazione chimica.

NC: non corrosivo.

OD: densità ottica.

PC: controllo positivo, una replica che contiene tutti i componenti di un sistema di prova e che è trattato con una sostanza che notoriamente induce una reazione positiva. Perché sia possibile valutare la variabilità nel tempo della risposta del controllo positivo, l'intensità di tale risposta non dovrebbe essere eccessiva.

Standard di prestazione: standard, basati su un metodo di riferimento validato, che consentono di valutare la comparabilità di un metodo proposto che è simile sotto il profilo strutturale e funzionale. Detti standard comprendono: i) gli elementi essenziali del metodo di prova; ii) un elenco minimo di sostanze chimiche di riferimento scelte tra le sostanze utilizzate per dimostrare le prestazioni accettabili del metodo di prova validato; e iii) in funzione dei risultati ottenuti con il metodo di riferimento validato, i livelli comparabili di affidabilità e accuratezza che il metodo proposto dovrebbe ottenere quando viene valutato utilizzando l'elenco minimo di sostanze di riferimento.

Pertinenza: descrizione del rapporto tra la prova e l'effetto studiato; indica se la prova è significativa e utile per uno scopo specifico. È il grado con cui la prova misura o prevede correttamente l'effetto biologico di interesse. La pertinenza comprende una valutazione dell'accuratezza (concordanza) di una prova (20).

Affidabilità: misura in cui l'esecuzione di un metodo di prova può essere riprodotta nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi seguendo il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità intra-laboratorio e inter-laboratori (20).

Sensibilità: proporzione di tutte le sostanze chimiche positive/attive correttamente classificate dal metodo di prova. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di un metodo di prova (20).

Corrosione cutanea *in vivo*: il manifestarsi di lesioni irreversibili della pelle, vale a dire, necrosi visibile dell'epidermide e del derma, a seguito dell'applicazione della sostanza chimica di prova per non più di quattro ore. Gli effetti tipici della corrosione sono ulcere, sanguinamento, croste sanguinolente e, al termine di un periodo di osservazione di 14 giorni, depigmentazione cutanea dovuta all'effetto sbiancante, chiazze di alopecia e cicatrici. Per valutare le lesioni dubbie potrebbe essere necessario ricorrere a un esame istopatologico.

Specificità: proporzione di tutte le sostanze chimiche negative/inattive correttamente classificate dal metodo di prova. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di un metodo di prova (20).

Sostanza: un elemento chimico e i suoi composti, allo stato naturale od ottenuti per mezzo di un procedimento di fabbricazione, compresi gli additivi necessari a mantenerne la stabilità e le impurezze derivanti dal procedimento utilizzato, ma esclusi i solventi che possono essere separati senza compromettere la stabilità della sostanza o modificarne la composizione.

Batteria di prove: consiste nel testare una sostanza chimica in esame in parallelo su almeno tre dischi di tessuto cutaneo di replica.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata applicando il presente metodo di prova.

Resistenza elettrica transcutanea (TER): misurazione dell'impedenza elettrica della pelle, come valore di resistenza espressa in kilo-ohm. Si tratta di un metodo al contempo semplice e affidabile per valutare la funzione di barriera tramite la registrazione del passaggio di ioni attraverso la pelle per mezzo di un ponte di Wheatstone.

UVCB: sostanze di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali biologici."

6) Nella parte B, il capitolo B.40 bis è sostituito dal seguente:

"B.40*bis* **CORROSIONE CUTANEA IN VITRO: METODO DI PROVA SU UN MODELLO DI EPIDERMIDE UMANA RICOSTITUITA (RhE)**

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 431 (2016). Per corrosione cutanea si intende la manifestazione di lesioni irreversibili della pelle in forma di necrosi visibile dell'epidermide e del derma, a seguito dell'applicazione della sostanza chimica in esame [secondo la definizione del Sistema globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (UN GHS) (1) e del regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele (CLP) ([1])]. Il presente metodo di prova B.40 *bis* aggiornato propone una procedura *in vitro* che consente di individuare le sostanze e le miscele non corrosive e corrosive conformemente al GHS dell'ONU e al regolamento CLP. Esso permette una parziale sottocategorizzazione delle sostanze corrosive.

2. Tradizionalmente, la valutazione del potenziale di corrosione cutanea è effettuata su animali da esperimento (metodo di prova B.4 equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 404 originariamente adottata nel 1981 e rivista nel 1992, nel 2002 e nel 2015) (2). Oltre al presente metodo di prova B.40 *bis* sono stati validati e adottati altri due metodi di prova *in vitro* per determinare la corrosività potenziale di sostanze chimiche, come ad esempio il metodo di prova B.40 (equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 430) (3) e il metodo di prova B.65 (equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 435) (4). È stato inoltre adottato il metodo di prova *in vitro* B.46 (equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 439) (5) per determinare il potenziale di irritazione cutanea. Un documento di orientamento dell'OCSE relativo agli approcci integrati in materia di prove e valutazioni (IATA – *Integrated Approaches to Testing and Assessment*) per la corrosione e l'irritazione cutanea descrive diversi moduli che raggruppano fonti di informazione e strumenti di analisi e i) fornisce orientamenti su come integrare e utilizzare i dati sperimentali e non sperimentali esistenti per valutare il potenziale di irritazione cutanea e di corrosione cutanea delle sostanze chimiche, e ii) propone un approccio quando occorrono prove ulteriori (6).

3. Il presente metodo di prova riguarda l'endpoint per la salute umana della corrosione cutanea. Esso utilizza un modello di epidermide umana ricostituita (RhE - *reconstructed human epidermis*) (ottenuta da cheratinociti non trasformati prelevati da epidermide umana) che riproduce fedelmente le proprietà istologiche, morfologiche, biochimiche e fisiologiche degli strati superiori della pelle umana (l'epidermide). La linea guida dell'OCSE corrispondente è stata originariamente adottata nel 2004 e aggiornata nel 2013 al fine di includere metodi di prova supplementari utilizzando i modelli di RhE e la possibilità di utilizzare i metodi a supporto della sottocategorizzazione delle sostanze chimiche corrosive, ed è stata poi aggiornata nel 2015 per richiamare il documento di orientamento IATA e introdurre l'uso di una procedura alternativa per misurare la vitalità.

4. Il presente metodo di prova comprende quattro modelli di RhE validati disponibili sul mercato. Per due di questi modelli di prova disponibili sul mercato, EpiSkin™ Standard Model (SM) e EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200), sono stati condotti degli studi di prevalidazione (7), seguiti da uno studio formale di validazione per valutare la corrosione cutanea (8) (9) (10) (11) (12) (di seguito denominati metodi di riferimento validati o VRM). I risultati di questi studi hanno permesso di stabilire che i due VRM di cui sopra possono essere utilizzati a fini regolamentari per distinguere le sostanze corrosive (C) da quelle non corrosive (NC) e che EpiSkin™ può inoltre essere utilizzato per sottocategorizzare le sostanze corrosive (13) (14) (15). Altri due modelli di prova *in vitro* di RhE per determinare la corrosione cutanea disponibili sul mercato hanno dato risultati simili a quelli del metodo di riferimento validato EpiDerm™ conformemente alla validazione basata sugli standard di prestazione (16) (17) (18). Si tratta di SkinEthic™ RHE ([2]) e epiCS® (precedentemente noto con il nome EST-1000) che possono anch'essi essere utilizzati a fini regolamentari per distinguere le sostanze corrosive da quelle non corrosive (19) (20). Gli studi di postvalidazione eseguiti dai produttori del modello di RhE tra il 2012 e il 2014 con un protocollo affinato che corregge le interferenze della riduzione non specifica dell'MTT da parte delle sostanze chimiche in esame hanno permesso di ottenere risultati migliori sia nella distinzione tra sostanze corrosive e non corrosive, sia nella sottocategorizzazione delle sostanze corrosive (21) (22). Sono state condotte ulteriori analisi statistiche dei dati di postvalidazione generati con EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE e EpiCS® per individuare modelli predittivi alternativi che hanno migliorato la capacità predittiva per la sottocategorizzazione (23).

([1]) Regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2008, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006 (GU L 353 del 31.12.2008, pag. 1).

([2]) L'acronimo RhE (epidermide umana ricostituita - *Reconstructed human Epidermis*) è utilizzato per tutti i modelli basati sulla tecnologia RhE. L'acronimo RHE utilizzato in associazione al modello SkinEthic™ ha lo stesso significato ma, facendo parte della denominazione di questo specifico metodo di prova commercializzato, è scritto tutto in lettere maiuscole.

5. Prima di poter utilizzare a fini regolamentari un metodo di prova *in vitro* su RhE per la corrosione cutanea proposto, simile o modificato, diverso dai VRM, occorre determinarne l'affidabilità, la pertinenza (accuratezza) e i limiti per l'uso proposto al fine di assicurare che sia simile ai VRM, conformemente ai requisiti degli standard di prestazione (24) stabiliti in linea con i principi del documento di orientamento dell'OCSE n. 34 (25). Il quadro del sistema dell'OCSE di reciproca accettazione dei dati sarà garantito solo una volta che i metodi di prova proposti, nuovi o aggiornati, conformi agli standard di prestazione sono stati esaminati e integrati nella corrispondente linea guida dell'OCSE. I modelli di prova inclusi nella linea guida possono essere utilizzati per rispondere alle prescrizioni dei paesi relative ai risultati della prova sul metodo di prova *in vitro* per determinare la corrosione cutanea, traendo al tempo stesso vantaggio dalla reciproca accettazione dei dati.

DEFINIZIONI

6. L'appendice 1 contiene le definizioni dei termini utilizzati.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

7. Il presente metodo di prova consente di individuare le sostanze e le miscele non corrosive e corrosive conformemente al GHS delle Nazioni Unite e al regolamento CLP. Il presente metodo di prova è alla base della sottocategorizzazione delle sostanze e delle miscele corrosive nella sottocategoria facoltativa 1A, conformemente al GHS delle Nazioni Unite (1), oltre che in una combinazione delle sottocategorie 1B e 1C (21) (22) (23). Un limite del presente metodo di prova è costituito dal fatto che non permette di distinguere tra le sottocategorie 1B e 1C di sostanze corrosive per la pelle, conformemente al GHS delle Nazioni Unite e al regolamento CLP, a causa del numero limitato di sostanze chimiche corrosive *in vivo* ben note della sottocategoria 1C. I modelli di prova EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE e epiCS® permettono la sottocategorizzazione (cioè 1A o 1B-e-1C o NC).

8. Nello studio di validazione dei modelli di prova inclusi nel presente metodo di prova utilizzati per individuare sostanze non corrosive e corrosive è stato testato un ampio spettro di sostanze chimiche, principalmente sostanze singole; la banca dati empirica dello studio di validazione contava 60 sostanze chimiche appartenenti a un'ampia gamma di classi chimiche (8) (9) (10). Le prove volte a dimostrare la sensibilità, la specificità, l'accuratezza e la riproducibilità intra-laboratorio della prova per la sottocategorizzazione sono state condotte dagli sviluppatori del metodo di prova e i risultati sono stati riesaminati dall'OCSE (21) (22) (23). I dati generali disponibili indicano che il metodo di prova è applicabile a un'ampia gamma di classi di sostanze chimiche e stati fisici, inclusi liquidi, semisolidi, solidi e cere. I liquidi possono essere acquosi o non acquosi, i solidi possono essere solubili o insolubili in acqua. Quando possibile, prima dell'applicazione i solidi dovrebbero essere frantumati in polvere fine; non sono necessarie altre forme di pretrattamento del campione. I modelli di prova inclusi nel presente metodo di prova non devono essere utilizzati con una categoria specifica di sostanze chimiche in esame qualora possa essere dimostrata la loro non applicabilità a tale categoria specifica. Inoltre, si presume che il presente metodo di prova sia applicabile alle miscele oltre che alle sostanze. Tuttavia, poiché le miscele coprono un ampio spettro di categorie e composizioni e tenuto conto delle informazioni limitate attualmente disponibili circa la sperimentazione sulle miscele, nei casi in cui sia possibile dimostrare che il metodo di prova non è applicabile a una categoria specifica di miscele (ad esempio applicando la strategia proposta in (26)) non si deve utilizzare il metodo di prova per tale categoria specifica di sostanze. Prima di applicare il presente metodo di prova a una miscela per generare dati ai fini regolamentari previsti, si deve considerare se, e in caso affermativo perché, esso possa fornire risultati adeguati a tale scopo. Tali considerazioni non sono necessarie laddove esista una disposizione normativa che obblighi a sottoporre a prova la miscela. I gas e gli aerosol non sono ancora stati valutati nell'ambito di studi di validazione (8) (9) (10). Benché sia ipotizzabile che essi possano essere testati utilizzando la tecnologia RhE, l'attuale metodo di prova non prevede l'esecuzione di prove per gas e aerosol.

9. Le sostanze chimiche in esame che assorbono la luce nello stesso spettro dell'MTT formazan e le sostanze chimiche in esame in grado di ridurre direttamente il colorante vitale MTT (in MTT formazan) possono interferire con le misurazioni di vitalità tessutale e richiedono l'utilizzo di controlli adattati per correggere tali interferenze. Il tipo di controlli adattati che possono essere necessari varierà in funzione del tipo di interferenze prodotte dalla sostanza chimica in esame e della procedura usata per misurare l'MTT formazan (cfr. i paragrafi da 25 a 31).

10. Se da un lato il presente metodo di prova non fornisce informazioni adeguate sull'irritazione cutanea, è opportuno notare che il metodo B.46 riguarda in modo specifico le prove d'irritazione cutanea *in vitro* e gli effetti sulla salute e si basa sullo stesso sistema di prova su RhE, benché usi un altro protocollo (5). Per una valutazione completa degli effetti cutanei locali dopo una singola esposizione della pelle, si raccomanda di consultare il documento di orientamento dell'OCSE relativo agli approcci integrati in materia di prove e valutazioni (IATA – *Integrated Approaches to Testing and Assessment*) (6). Gli IATA prevedono la realizzazione di prove *in vitro* volte a determinare la corrosione cutanea (come descritta nel presente metodo di prova) e l'irritazione cutanea prima di prevedere la conduzione di test su animali vivi. È noto che l'utilizzo di pelle umana è oggetto di considerazioni etiche e soggetto a condizioni nazionali ed internazionali.

PRINCIPIO DELLA PROVA

11. La sostanza chimica in esame viene applicata localmente ad un modello tridimensionale di epidermide umana ricostituita, composta da cheratinociti non trasformati prelevati da epidermide umana, messi in coltura per formare un modello multistrato, altamente differenziato, di epidermide umana. Il modello è costituito da uno strato basale, uno strato spinoso e uno strato granuloso organizzati e da uno strato corneo multiplo contenente strati di strutture lamellari lipidiche intercellulari rappresentanti le principali classi lipidiche analoghe a quelle presenti *in vivo*.

12. Il metodo di prova su RhE si basa sulla premessa secondo cui le sostanze chimiche corrosive sono in grado di penetrare nello strato corneo per diffusione o erosione e sono citotossiche per gli strati cellulari sottostanti. La vitalità cellulare è misurata tramite conversione enzimatica del colorante vitale MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-ile)-2,5-difeniltetrazolio bromuro, tiazolil blu tetrazolio bromuro; numero CAS 298-93-1], in un sale, il blu di formazan, misurato quantitativamente dopo l'estrazione dai tessuti (27). Le sostanze chimiche corrosive sono identificate per la loro capacità di diminuire la vitalità cellulare al di sotto di determinati livelli soglia (cfr. i paragrafi 35 e 36). È stato dimostrato che il metodo di prova della corrosione cutanea su RhE consente di prevedere gli effetti della corrosione cutanea *in vivo* nel coniglio valutata conformemente al metodo di prova B.4 (2).

DIMOSTRAZIONE DELLA COMPETENZA DI LABORATORIO

13. Prima di utilizzare sistematicamente uno qualsiasi dei quattro modelli di prova su RhE validati e conformi al presente metodo di prova, i laboratori dimostrano la loro competenza tecnica classificando correttamente le dodici sostanze chimiche per la verifica della competenza tecnica di cui alla tabella 1. Nel caso in cui sia utilizzato un metodo di sottoclassificazione, è dimostrata anche la corretta sottocategorizzazione. Nel caso in cui una sostanza in elenco non sia disponibile o nel caso in cui sia giustificato, può essere utilizzata un'altra sostanza per la quale sono disponibili dati di riferimento *in vivo* e *in vitro* (ad esempio scegliendo dalla lista delle sostanze chimiche di riferimento (24)) a condizione che siano applicati i medesimi criteri di selezione di cui alla tabella 1.

Tabella 1

elenco delle sostanze di prova a fini di competenza ([1])

Sostanza	n. CAS	Classe chimica ([2])	Cat. GHS dell'ONU/ CLP sulla base dei risultati in vivo ([3])	Cat. VRM sulla base dei risultati in vitro ([4])	Riduttore dell'MTT ([5])	Stato fisico
Sostanze corrosive *in vivo* della sottocategoria 1A						
Acido bromoacetico	79-08-3	Acido organico	1A	(3) 1A	—	S
Trifluoruro di boro diidrato	13319-75-0	Acido inorganico	1A	(3) 1A	—	L
Fenolo	108-95-2	Fenolo	1A	(3) 1A	—	S
Cloruro di dicloroacetile	79-36-7	Elettrofilo	1A	(3) 1A	—	L
Combinazione di sostanze corrosive *in vivo* delle sottocategorie 1B-e-1C						
Acido glicossilico monoidrato	563-96-2	Acido organico	1B-e-1C	(3) 1B-e-1C	—	S

Sostanza	n. CAS	Classe chimica ([2])	Cat. GHS dell'ONU/ CLP sulla base dei risultati in vivo ([3])	Cat. VRM sulla base dei risultati in vitro ([4])	Riduttore dell'MTT ([5])	Stato fisico
Sostanze corrosive *in vivo* della sottocategoria 1A						
Acido lattico	598-82-3	Acido organico	1B-e-1C	(3) 1B-e-1C	—	L
Etanolammina	141-43-5	Base organica	1B	(3) 1B-e-1C	Y	Viscoso
Acido cloridrico (14,4 %)	7647-01-0	Acido inorganico	1B-e-1C	(3) 1B-e-1C	—	L
Sostanze non corrosive *in vivo*						
Fenetil bromuro	103-63-9	Elettrofilo	NC	(3) NC	Y	L
4-amino-1,2,4-triazolo	584-13-4	Base organica	NC	(3) NC	—	S
4-(metiltio)-benzaldeide	3446-89-7	Elettrofilo	NC	(3) NC	Y	L
Acido laurico	143-07-7	Acido organico	NC	(3) NC	—	S

Abbreviazioni: n. CAS = numero di registrazione CAS (*Chemical Abstracts Service Registry Number*); VRM = metodo di riferimento validato; NC = non corrosivo; Y = sì; S = solido; L = liquido.

([1]) Le sostanze di prova a fini di competenza, classificate dapprima come corrosive o non corrosive, poi per sottocategoria di sostanze corrosive e poi per classe chimica, sono state selezionate tra le sostanze utilizzate negli studi di validazione dell'ECVAM per EpiSkin™ e EpiDerm™ (8) (9) (10) e negli studi di postvalidazione basati sui dati forniti dagli sviluppatori di EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ e epiCS® (23). Salvo indicazione contraria, le sostanze sono state sottoposte a prova al livello di purezza ottenuto per le sostanze provenienti dal mercato (8) (10). Nella misura del possibile, nella selezione sono state incluse sostanze che: i) sono rappresentative dello spettro di reazioni di corrosività (ad esempio non corrosive, da poco a fortemente corrosive) che i VRM possono misurare o prevedere; ii) sono rappresentative delle classi chimiche usate negli studi di validazione; iii) hanno strutture chimiche ben definite; iv) permettono di ottenere risultati riproducibili nel VRM; v) permettono di ottenere risultati definitivi con il metodo di prova di riferimento *in vivo*; vi) sono disponibili sul mercato; e vii) non comportano costi di smaltimento proibitivi.

([2]) Classe chimica assegnata da Barratt *et al*. (8).

([3]) I gruppi di imballaggio delle Nazioni Unite I, II e III corrispondono rispettivamente alle categorie 1A, 1B e 1C del GHS delle Nazioni Unite/regolamento CLP.

([4]) Le previsioni del VRM *in vitro* riportate nella presente tabella sono state ottenute con i modelli di prova EpiSkin™ e EpiDerm™ (VRM) nel corso delle prove di postvalidazione eseguite dagli sviluppatori del metodo di prova.

([5]) I valori della vitalità ottenuti negli studi di validazione per la corrosione cutanea dell'ECVAM non sono stati corretti per la riduzione diretta dell'MTT (negli studi di validazione non sono stati realizzati controlli su tessuti uccisi). Tuttavia, i dati di postvalidazione generati dagli sviluppatori del metodo di prova presentati nella presente tabella sono stati ottenuti con controlli adattati (23).

14. Nell'ambito della dimostrazione delle competenze, si raccomanda che l'utente si accerti delle proprietà di barriera dei tessuti dopo averli ricevuti, in conformità alle specifiche del produttore del modello di epidermide umana ricostituita. Tale verifica è particolarmente importante se i tessuti vengono trasportati per lunghe distanze/per viaggi lunghi. Quando un metodo di prova è consolidato e il suo uso corretto da parte del laboratorio è stato dimostrato, non è più necessario effettuare la verifica in maniera sistematica. Tuttavia, se un metodo di prova viene sistematicamente utilizzato, si raccomanda di continuare a verificare le proprietà di barriera a intervalli regolari.

PROCEDURA

15. Quella che segue è una descrizione generica dei componenti e delle procedure dei modelli di prova su RhE per valutare la corrosione cutanea che rientrano nel presente metodo di prova. I modelli di RhE riconosciuti come scientificamente validi per l'uso nel presente metodo di prova, ossia i modelli EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE e epiCS® (16)(17)(19)(28)(29)(30)(31)(32)(33), possono essere ottenuti sul mercato. Esistono procedure operative standard per questi quattro modelli di RhE (34) (35) (36) (37) e le componenti dei loro principali metodi di prova sono sintetizzate nell'appendice 2. Si raccomanda la consultazione delle procedure operative standard pertinenti al momento di attuare e utilizzare uno di tali modelli in laboratorio. Le prove con i quattro modelli di RhE che rientrano nel presente metodo di prova sono conformi a quanto segue.

COMPONENTI DEL METODO DI PROVA SU EPIDERMIDE UMANA RICOSTITUITA

Condizioni generali

16. Per ricostruire l'epitelio devono essere utilizzati cheratinociti non trasformati di origine umana. Devono essere presenti molteplici strati di cellule epiteliali vitali (strato basale, strato spinoso, strato granuloso) sotto uno strato corneo funzionale. Lo strato corneo deve presentare molteplici strati con il profilo lipidico necessario per costituire una barriera funzionale solida capace di resistere alla penetrazione rapida delle sostanze chimiche di riferimento citotossiche, ad esempio, sodio dodecil solfato (SDS) o Triton X-100. La funzione di barriera deve essere dimostrata e può essere valutata determinando la concentrazione alla quale una sostanza chimica di riferimento riduce la vitalità dei tessuti del 50 % (IC_{50}) dopo un tempo di esposizione fisso oppure determinando il tempo di esposizione necessario per ridurre la vitalità cellulare del 50 % (ET_{50}) dopo l'applicazione della sostanza chimica di riferimento a una concentrazione fissa predeterminata (cfr. il paragrafo 18). Le proprietà di contenimento del modello di RhE devono essere tali da impedire il passaggio di materiale attorno allo strato corneo verso i tessuti vitali, che inciderebbe negativamente sulla qualità della modellizzazione dell'esposizione cutanea. Il modello di epidermide umana ricostituita non deve essere contaminato da batteri, virus, micoplasmi o funghi.

Condizioni funzionali

Vitalità

17. La prova usata per quantificare la vitalità del tessuto è il test dell'MTT (27). Le cellule vitali del modello di RhE riducono il colorante vitale MTT a un precipitato MTT blu di formazan che è successivamente estratto dal tessuto utilizzando isopropanolo (o un solvente analogo). La densità ottica (OD) del solo solvente di estrazione dovrebbe essere sufficientemente bassa, ossia OD < 0,1. L'MTT formazan estratto può essere quantificato utilizzando una misurazione di assorbanza standard (OD) o una procedura di spettrofotometria HPLC/UPLC (38). Gli utilizzatori del modello di RhE devono accertarsi che ciascun lotto del modello impiegato soddisfi i criteri definiti per il controllo negativo. È opportuno che lo sviluppatore/il fornitore del modello di RhE stabilisca un intervallo di accettabilità (limite superiore e inferiore) dei valori di OD del controllo negativo. L'intervallo di accettabilità dei valori di densità ottica del controllo negativo per i quattro modelli di prova di RhE inclusi nel presente metodo di prova è illustrato nella tabella 2. L'utilizzatore di spettrofotometria HPLC/UPLC applicherà gli intervalli di OD del controllo negativo di cui alla tabella 2 come criteri di accettabilità del controllo negativo. Occorre documentare che i tessuti trattati con il controllo negativo sono stabili in coltura (ossia risultano misurazioni di OD simili) per tutto il periodo di esposizione.

Tabella 2

Intervalli di accettabilità dei valori di OD del controllo negativo per verificare la qualità del lotto

	Limite di accettabilità inferiore	Limite di accettabilità superiore
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

Funzione di barriera

18. Lo strato corneo e la relativa composizione lipidica devono essere sufficienti per resistere alla penetrazione rapida di alcuni marcatori citotossici (come SDS o Triton X-100), valutata tramite i fattori IC_{50} o ET_{50} (tabella 3). La funzione di barriera di ciascun lotto del modello di RhE utilizzato deve essere dimostrata dallo sviluppatore/venditore del modello di RhE al momento di fornire il tessuto all'utilizzatore finale (cfr. il paragrafo 21).

Morfologia

19. L'esame istologico del modello di RhE è eseguito dimostrando la struttura multistrato analoga all'epidermide umana contenente uno strato basale, uno strato spinoso, uno strato granuloso e uno strato corneo, e mostra un profilo lipidico simile a quello dell'epidermide umana. Al momento di fornire il tessuto all'utilizzatore finale, lo sviluppatore/venditore del modello di RhE trasmette l'esame istologico di ciascun lotto del modello di RhE utilizzato che dimostra la morfologia del tessuto appropriata (cfr. il paragrafo 21).

Riproducibilità

20. Gli utilizzatori del metodo di prova ne dimostrano la riproducibilità nel tempo con controlli positivi e negativi. Inoltre, il metodo di prova è utilizzato solo se lo sviluppatore/fornitore del modello di RhE fornisce dati che dimostrano la riproducibilità nel tempo con sostanze chimiche corrosive e non corrosive che figurano, ad esempio, nell'elenco delle sostanze di prova a fini di competenza (tabella 1). Nel caso in cui sia utilizzato un metodo di prova per la sottocategorizzazione, ne è dimostrata la riproducibilità anche in relazione alla sotto-categorizzazione.

Controllo di qualità (QC)

21. Il modello di RhE è utilizzato solo se lo sviluppatore/fornitore dimostra che ogni lotto del modello utilizzato rispetta determinati criteri di fabbricazione, i più rilevanti dei quali riguardano la *vitalità* (paragrafo 17), la *funzione di barriera* (paragrafo 18) e la *morfologia* (paragrafo 19). Tali informazioni devono essere fornite agli utilizzatori del metodo di prova, perché possano inserirle nella relazione di prova. Per una previsione affidabile degli effetti corrosivi possono essere considerati accettabili solo i risultati ottenuti con lotti di tessuto che hanno superato il controllo di qualità. Lo sviluppatore/il fornitore del modello di RhE stabilisce un intervallo di accettabilità (limite superiore e inferiore) per i valori di IC_{50} o di ET_{50}. Nella tabella 3 sono riportati gli intervalli di accettabilità per i quattro modelli di prova validati.

Tabella 3

Criteri di controllo di qualità dei lotti

	Limite di accettabilità inferiore	Limite di accettabilità superiore
EpiSkin™ (SM) (trattamento di 18 ore con SDS) (33).	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 ore	ET_{50} = 8,7 ore
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET_{50} = 4,0 ore	ET_{50} = 10,0 ore
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET_{50} = 2,0 ore	ET_{50} = 7,0 ore

Applicazione delle sostanze chimiche in esame e delle sostanze chimiche di controllo

22. Sono utilizzate almeno due repliche di tessuti per ciascuna sostanza chimica in esame e sostanza di controllo per ogni tempo di esposizione. Per le sostanze chimiche sia liquide che solide occorre applicare una quantità sufficiente della sostanza in esame fino a coprire uniformemente la superficie dell'epidermide evitando nel contempo una dose infinita, ossia un minimo di 70 µl/cm^2 o 30 mg/cm^2. A seconda dei modelli, la superficie dell'epidermide deve essere inumidita con acqua deionizzata o distillata prima dell'applicazione di sostanze chimiche solide, al fine di migliorare il contatto tra la sostanza chimica in esame e la superficie dell'epidermide (34) (35) (36) (37). Quando possibile, i solidi dovrebbero essere testati sotto forma di polvere fine. Il metodo

d'applicazione deve essere adatto alla sostanza chimica in esame [cfr., ad esempio, i riferimenti da (34) a (37)] Al termine del periodo di esposizione, la sostanza chimica in esame deve essere dilavata con cura dall'epidermide utilizzando un tampone acquoso o NaCl allo 0,9 %. A seconda di quale modello di prova di RhE tra i quattro validati si usa, si ricorre a due o tre periodi di esposizione per ogni sostanza chimica in esame (per tutti e quattro i modelli di RhE validati: 3 minuti e 1 ora; per EpiSkin™: un periodo di esposizione supplementare di 4 ore). In funzione del modello di prova di RhE e del periodo di esposizione valutati, la temperatura di incubazione durante l'esposizione può variare tra la temperatura ambiente e 37 °C.

23. Occorre utilizzare simultaneamente controlli negativi (NC) e controlli positivi (PC) per ogni batteria di prove al fine di dimostrare che la vitalità (nel caso del controllo negativo), la funzione di barriera e la conseguente sensibilità (nel caso del controllo positivo) dei tessuti rientrano in un intervallo di accettabilità storico determinato. Le sostanze chimiche proposte ai fini dei controlli positivi sono l'acido acetico glaciale o l'8N KOH, a seconda del modello di RhE utilizzato. Si noti che l'8N KOH è un riduttore diretto dell'MTT che può richiedere controlli adattati quali quelli descritti ai paragrafi 25 e 26. Le sostanze proposte per i controlli negativi sono NaCl allo 0,9 % (p/v) o l'acqua.

Misurazione della vitalità cellulare

24. Il test dell'MTT è un metodo quantitativo per misurare la vitalità cellulare nell'ambito del presente metodo di prova (27). Il campione di tessuto è immerso in una soluzione MTT alla concentrazione adeguata (0,3 o 1 mg/ml) per 3 ore. Il precipitato di blu di formazan che si forma è successivamente estratto dal tessuto con un solvente (ad esempio isopropanolo, isopropanolo acidico), e ne viene misurata la concentrazione o determinando la densità ottica a 570 nm con un filtro passa-banda della larghezza massima di ± 30 nm o con una procedura di spettrofotometria HPLC/UPLC (cfr. i paragrafi 30 e 31) (38).

25. Le sostanze chimiche in esame possono interferire con il test dell'MTT, per riduzione diretta dell'MTT in blu di formazan e/o per interferenza sul colore se la sostanza chimica in esame assorbe, naturalmente o in seguito a procedure di trattamento, nello stesso intervallo di OD del formazan (570 ± 30 nm, principalmente sostanze chimiche blu e viola). Vanno usati controlli supplementari per individuare e correggere potenziali interferenze di dette sostanze chimiche in esame come il controllo della riduzione non specifica dell'MTT (NSMTT) e il controllo del colore non specifico (NSC) (cfr. i paragrafi da 26 a 30). Quanto precede è particolarmente importante quando una sostanza chimica in esame non è rimossa completamente dal tessuto mediante risciacquo o penetra nell'epidermide ed è pertanto presente nel tessuto nel momento in cui viene eseguita la prova di vitalità MTT. Per una descrizione dettagliata di come correggere la riduzione diretta dell'MTT e le interferenze da parte degli agenti coloranti consultare le procedure operative standard dei tre modelli di prova (34) (35) (36) (37).

26. Per individuare i riduttori diretti dell'MTT, aggiungere ciascuna sostanza chimica in esame al mezzo contenente MTT appena preparato (34) (35) (36) (37). Se la miscela di MTT contenente la sostanza chimica in esame diventa blu/viola, si presume che la sostanza chimica in esame sia un riduttore diretto dell'MTT e si esegue un ulteriore controllo funzionale sull'epidermide non vitale, indipendentemente dall'uso della misurazione di assorbanza standard (OD) o di una procedura di spettrometria HPLC/UPLC. Tale controllo funzionale supplementare viene effettuato su tessuti uccisi che presentano solo un'attività metabolica residua ma assorbono la sostanza chimica in esame in quantità simili ai tessuti vitali. Ogni riduttore chimico dell'MTT è applicato su almeno due repliche di tessuti uccisi per tempo di esposizione, sottoposte all'intera prova di corrosione cutanea. La reale vitalità del tessuto è poi calcolata come la percentuale di vitalità tessutale ottenuta con tessuti vivi esposti al riduttore dell'MTT meno la percentuale della riduzione non specifica dell'MTT ottenuta con i tessuti uccisi esposti al medesimo riduttore dell'MTT, calcolata in funzione della batteria di prove del controllo negativo testato in parallelo alla prova da correggere (% NSMTT).

27. Per individuare l'interferenza potenziale di sostanze chimiche in esame colorate o che si colorano a contatto con l'acqua o l'isopropanolo e stabilire la necessità di controlli supplementari, si esegue un'analisi dello spettro della sostanza chimica in esame nell'acqua (ambiente al momento dell'esposizione) e/o nell'isopropanolo (solvente di estrazione). Se la sostanza chimica in esame nell'acqua o nell'isopropanolo assorbe la luce nell'intervallo di 570 ± 30 nm, si procede con ulteriori controlli del colorante o, in alternativa, con una procedura di spettrofotometria HPLC/UPLC qualora tali controlli non siano necessari (cfr. i paragrafi 30 e 31). Nell'eseguire una misurazione dell'assorbanza standard (OD), ciascuna sostanza chimica in esame colorata che causa un'interferenza è applicata su almeno due repliche di tessuti vitali per tempo di esposizione sottoposte all'intera prova di corrosione cutanea, con la differenza che sono incubate in un mezzo anziché in una soluzione di MTT durante la fase di incubazione dell'MTT per generare un controllo del colore non specifico (NSC_{living}). Il controllo

NSC_{living} deve essere eseguito parallelamente, per tempo di esposizione e per sostanza chimica in esame colorata (in ogni batteria di prove) a causa della variabilità biologica intrinseca dei tessuti vivi. La reale vitalità del tessuto è poi calcolata come la percentuale della vitalità tessutale ottenuta con tessuti vivi esposti alla sostanza chimica in esame che provoca un'interferenza e incubati con la soluzione di MTT meno la percentuale di colore non specifico ottenuto con tessuti vivi esposti alla sostanza chimica in esame che provoca un'interferenza e incubati nel mezzo senza MTT in parallelo alla prova da correggere (% NSC_{living}).

28. Per le sostanze chimiche in esame identificate come all'origine sia di una riduzione diretta dell'MTT (cfr. il paragrafo 26) sia di un'interferenza cromatica (cfr. il paragrafo 27) occorre una terza batteria di prove, distinta dai controlli NSMTT e NSC_{living} descritti nel paragrafo precedente, quando si effettua la misurazione dell'assorbanza standard (OD). È quanto avviene solitamente con le sostanze chimiche in esame di colore scuro che interferiscono con il test dell'MTT (ad esempio blu, viola, nero) perché il loro colore intrinseco impedisce di valutarne la capacità di ridurre direttamente l'MTT come descritto al paragrafo 26. Poiché tali sostanze chimiche in esame possono legarsi sia ai tessuti vivi che ai tessuti uccisi, il controllo NSMTT potrebbe correggere non solo il potenziale di riduzione diretta dell'MTT, ma anche l'interferenza cromatica generata dal legame tra la sostanza chimica in esame e i tessuti uccisi. Si potrebbe avere di conseguenza una doppia correzione dell'interferenza cromatica perché il controllo NSC_{living} corregge già l'interferenza cromatica causata dal legame tra la sostanza chimica in esame e i tessuti vivi. Per evitare una possibile doppia correzione dell'interferenza cromatica si deve eseguire un terzo controllo per il colore non specifico nei tessuti uccisi (NSC_{killed}). In questo controllo supplementare la sostanza chimica in esame è applicata su almeno due repliche di tessuti uccisi sottoposte all'intera prova della corrosione cutanea per tempo di esposizione, ma che sono incubate in un mezzo invece che nella soluzione di MTT durante la fase di incubazione dell'MTT. Per ciascuna sostanza chimica in esame è sufficiente un unico controllo NSC_{killed} a prescindere dal numero di prove indipendenti/batterie di prove eseguite, ma dovrebbe essere condotto parallelamente al controllo NSMTT e, ove possibile, con lo stesso lotto di tessuto. La reale vitalità del tessuto è poi calcolata come la percentuale della vitalità tessutale ottenuta con i tessuti vivi esposti alla sostanza chimica in esame meno %NSMTT meno $\%NSC_{living}$ più la percentuale di colore non specifico ottenuto con tessuti uccisi esposti alla sostanza chimica in esame che provoca un'interferenza e incubati nel mezzo senza MTT, calcolata in rapporto alla prova per il controllo negativo in parallelo alla prova da correggere (% NSC_{killed}).

29. È importante notare che la riduzione non specifica dell'MTT e le interferenze del colore non specifico possono portare le rilevazioni dell'estratto di tessuto al di sopra dell'intervallo di linearità dello spettrofotometro. Di conseguenza ogni laboratorio dovrebbe determinare l'intervallo di linearità del proprio spettrofotometro con l'MTT formazan (n. CAS 57360-69-7) disponibile sul mercato prima di iniziare a testare le sostanze chimiche in esame a fini regolamentari. In particolare la misurazione dell'assorbanza standard (OD) che utilizza uno spettrofotometro è adatta a valutare i riduttori diretti dell'MTT e le sostanze chimiche in esame che provocano un'interferenza del colore quando le OD degli estratti di tessuto ottenute con le sostanze chimiche in esame senza alcuna correzione della riduzione diretta dell'MTT e/o interferenza del colore rientrano nell'intervallo di linearità dello spettrofotometro o quando la percentuale della vitalità non corretta ottenuta con la sostanza chimica in esame l'ha già classificata come corrosiva (cfr. i paragrafi 35 e 36). Tuttavia, i risultati per le sostanze chimiche in esame che producono %NSMTT e/o $\%NSC_{living}$ > 50 % del controllo negativo vanno presi con cautela.

30. Per le sostanze chimiche in esame colorate non compatibili con la misurazione dell'assorbanza standard (OD) a causa dell'eccessiva interferenza con il test dell'MTT si può utilizzare la procedura alternativa della spettrofotometria HPLC/UPLC per misurare l'MTT formazan (cfr. il paragrafo 31) (37). Il sistema di spettrofotometria HPLC/UPLC consente di separare l'MTT formazan dalla sostanza chimica in esame prima della sua quantificazione (38). Per questo motivo non sono mai necessari i controlli NSC_{living} o NSC_{killed} quando si utilizza la spettrofotometria HPLC/UPLC, indipendentemente dalla sostanza chimica in esame. I controlli NSMTT sono tuttavia necessari se si sospetta che la sostanza chimica in esame sia un riduttore diretto dell'MTT o se il suo colore impedisce di valutare il potenziale di riduzione diretta dell'MTT (come descritto al paragrafo 26). Quando si utilizza la spettrofotometria HPLC/UPLC per misurare l'MTT formazan, la percentuale di vitalità tessutale è calcolata come percentuale dell'area di picco di MTT formazan ottenuta con tessuti vivi esposti alla sostanza chimica in esame in rapporto all'area di

picco dell'MTT formazan ottenuta con il controllo negativo in parallelo. Per le sostanze chimiche in esame che sono riduttori diretti dell'MTT, la reale vitalità tessutale è calcolata come la percentuale della vitalità tessutale ottenuta con tessuti vivi esposti alla sostanza chimica in esame meno %NSMTT. Si noti infine che non è possibile valutare i riduttori diretti dell'MTT che possono anche provocare un'interferenza del colore e che sono trattenuti nel tessuto dopo il trattamento e la cui capacità di riduzione dell'MTT è tale da provocare delle OD (utilizzando la misurazione di OD standard) o aree di picco (utilizzando la spettrofotometria UPLC/HPLC) degli estratti di tessuto testato che non rientrano nell'intervallo di linearità dello spettrofotometro, un caso che, tuttavia, dovrebbe verificarsi solo molto raramente.

31. La spettrofotometria HPLC/UPLC può essere utilizzata per misurare l'MTT formazan anche con tutti i tipi di sostanze chimiche in esame (colorate, non colorate, riduttori e non riduttori dell'MTT) (38). Considerata la diversità tra i sistemi di spettrofotometria HPLC/UPLC, la qualificazione del sistema di spettrofotometria HPLC/UPLC va dimostrata prima del suo utilizzo per quantificare l'MTT formazan dagli estratti di tessuto soddisfacendo i criteri di accettabilità per una serie di parametri di qualificazione standard basati su quelli descritti nelle raccomandazioni per l'industria della *Food and Drug Administration* degli Stati Uniti sulla validazione del metodo bioanalitico (38) (39). Tali parametri fondamentali e i loro criteri di accettazione sono illustrati nell'appendice 4. Una volta soddisfatti i criteri di accettazione definiti nell'appendice 4, si considera che il sistema di spettrofotometria HPLC/UPLC abbia dimostrato di essere adatto e pronto a misurare l'MTT formazan nelle condizioni sperimentali descritte nel presente metodo di prova.

Criteri di accettabilità

32. Per ciascun metodo di prova che ricorre a modelli di RhE validi, i tessuti trattati con i controlli negativi presentano una OD che rispecchia la qualità dei tessuti descritta nella tabella 2 e non sono inferiori ai limiti storici. I tessuti trattati con i controlli positivi, ossia l'acido acetico glaciale o l'8N KOH, rispecchiano la capacità dei tessuti di reagire a una sostanza chimica corrosiva nelle condizioni del modello di prova (cfr. l'appendice 2). La variabilità tra le repliche di tessuti per la sostanza chimica in esame e/o le sostanze chimiche di controllo deve collocarsi all'interno dei limiti accettati per ciascun requisito dei modelli di RhE validi (cfr. l'appendice 2) (ossia, la differenza di vitalità tra le due repliche di tessuti non deve superare il 30 %). Se il controllo negativo o quello positivo inclusi in una batteria di prove si situano al di fuori dell'intervallo di accettabilità, la batteria di prove è considerata come non qualificata e deve essere ripetuta. Se la variabilità delle sostanze chimiche in esame non rientra nell'intervallo definito, la prova va ripetuta.

Interpretazione dei risultati e modello predittivo

33. I valori della OD ottenuti per ciascuna sostanza chimica in esame sono utilizzati per calcolare la percentuale di vitalità rispetto al controllo negativo, il cui valore è fissato al 100 %. Nel caso in cui si ricorra alla spettrofotometria HPLC/UPLC, la percentuale di vitalità tessutale è calcolata come la percentuale dell'area di picco dell'MTT formazan ottenuta con tessuti vivi esposti alla sostanza chimica in esame rispetto al picco dell'MTT formazan ottenuto con il controllo negativo parallelo. I valori limite della percentuale di vitalità cellulare che permettono di distinguere le sostanze chimiche in esame corrosive da quelle non corrosive (o di distinguere le diverse sottocategorie di sostanze corrosive) sono definiti nei seguenti paragrafi 35 e 36 per ciascun modello di prova contemplato dal presente metodo di prova e sono utilizzati per interpretare i risultati.

34. Una singola batteria di prove costituita da almeno due repliche di tessuti è sufficiente per una sostanza chimica in esame, se la classificazione che ne risulta è inequivocabile. Tuttavia, in caso di risultati ambigui, tra cui misurazioni delle repliche discordanti, si dovrebbe considerare l'opportunità di eseguire una seconda batteria di prove, oltre che una terza nell'eventualità di risultati discordanti tra le prime due.

35. Nella tabella 4 è illustrato il modello predittivo per il modello di prova della corrosione cutanea EpiSkin™ (9) (22) (34), associato al sistema di classificazione del GHS delle Nazioni Unite/regolamento CLP.

Tabella 4

Modello predittivo EpiSkin™

Vitalità misurata dopo diversi tempi di esposizione (t=3, 60 e 240 minuti)	Previsione da considerare
< 35 % dopo 3 minuti di esposizione	**Sostanza chimica corrosiva:** •sottocategoria 1A (*) facoltativa
≥ 35 % dopo 3 minuti di esposizione **E** < 35 % dopo 60 minuti di esposizione **O** ≥ 35 % dopo 60 minuti di esposizione **E** < 35 % dopo 240 minuti di esposizione	**Sostanza chimica corrosiva:** •Combinazione delle sottocategorie facoltative 1B-e-1C
≥ 35 % dopo 240 minuti di esposizione	**Sostanza chimica non corrosiva**

(*) Stando ai dati generati per valutare l'utilità dei modelli di prova su RhE a fini di sottocategorizzazione, è stato dimostrato che circa il 22 % dei risultati del modello di prova EpiSkin™ della sottocategoria 1A possono costituire sostanze/miscele delle sottocategorie 1B o 1C (sovraclassificazione) (cfr. l'appendice 3).

36. Nella tabella 5 sono illustrati i modelli predittivi per i modelli di prova per la corrosione cutanea EpiDerm™ SCT (10) (23) (35), SkinEthic™ RHE (17) (18) (23) (36), e epiCS® (16) (23) (37) associati al sistema di classificazione del GHS delle Nazioni Unite/regolamento CLP.

Tabella 5

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE e epiCS®

Vitalità misurata dopo diversi tempi di esposizione (t=3 e 60 minuti)	Previsione da considerare
FASE 1 per EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE e epiCS®	
< 50 % dopo 3 minuti di esposizione	**Sostanza chimica corrosiva**
≥ 50 % dopo 3 minuti di esposizione **E** < 15 % dopo 60 minuti di esposizione	**Sostanza chimica corrosiva**
≥ 50 % dopo 3 minuti di esposizione **E** ≥ 15 % dopo 60 minuti di esposizione	**Sostanza chimica non corrosiva**
FASE 2 per EpiDerm™ SCT - per sostanze/miscele individuate come corrosive nella fase 1	
< 25 % dopo 3 minuti di esposizione	Sottocategoria 1A* facoltativa

Vitalità misurata dopo diversi tempi di esposizione (t=3 e 60 minuti)	Previsione da considerare
FASE 1 per EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE e epiCS®	
≥ 25 % dopo 3 minuti di esposizione	Combinazione delle sottocategorie facoltative 1B-e-1C
FASE 2 per SkinEthic™ RHE - per sostanze/miscele individuate come corrosive nella fase 1	
< 18 % dopo 3 minuti di esposizione	Sottocategoria 1A* facoltativa
≥ 18 % dopo 3 minuti di esposizione	Combinazione delle sottocategorie facoltative 1B-e-1C
FASE 2 per epiCS® - per sostanze/miscele individuate come corrosive nella fase 1	
< 15 % dopo 3 minuti di esposizione	Sottocategoria 1A* facoltativa
≥ 15 % dopo 3 minuti di esposizione	Combinazione delle sottocategorie facoltative 1B-e-1C

DATI E RELAZIONE

Dati

37. Per ciascuna prova, i dati ottenuti da singole repliche dei tessuti (ad esempio, i valori OD e le percentuali di vitalità cellulare calcolate per ogni sostanza chimica in esame, compresa la relativa classificazione) sono presentati sotto forma di tabella, compresi i dati delle prove ripetute, secondo le necessità. Sono inoltre riportati le medie e gli intervalli di vitalità e i coefficienti di variazione tra le repliche di tessuti per ciascuna prova. Per ogni sostanza chimica testata devono essere segnalate le interazioni osservate tra il reagente MTT e i riduttori diretti dell'MTT o le sostanze chimiche colorate in esame.

Relazione sull'esecuzione della prova

38. La relazione sull'esecuzione della prova deve comprendere le seguenti informazioni.

Sostanze chimiche in esame e sostanze chimiche di controllo:

— sostanza monocostituente: dati di identificazione chimica, come denominazioni IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula strutturale, purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc.;

— sostanza multicostituente, UVCB o miscela: caratterizzata nella massima misura possibile con l'identità chimica (cfr. sopra), con la presenza quantitativa e con le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti;

— aspetto fisico, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche;

— origine, numero del lotto se disponibile;

— trattamento delle sostanze chimiche in esame/sostanze di controllo prima della prova, se applicabile (ad esempio, riscaldamento, frantumazione);

— stabilità della sostanza chimica in esame, data limite di utilizzo, data della nuova analisi, se nota;

— condizioni di conservazione.

Modello di RhE e protocollo utilizzati; motivo della scelta (se del caso)

Condizioni sperimentali:

— modello di RhE utilizzato (incluso il numero di lotto);

— informazioni su taratura degli apparecchi di misurazione (ad esempio spettrofotometro), lunghezza d'onda e banda passante (se del caso), utilizzate per quantificare l'MTT formazan e l'intervallo di linearità dell'apparecchio di misurazione;

— descrizione del metodo utilizzato per quantificare l'MTT formazan;

— descrizione delle specifiche del sistema di spettrofotometria HPLC/UPLC, se del caso;

— informazioni complete di supporto sul modello di RhE specifico utilizzato e sulla sua efficienza, che includono (elenco non esaustivo):

i) vitalità;

ii) funzione di barriera;

iii) morfologia;

iv) riproducibilità e capacità predittiva;

v) controlli di qualità (QC) del modello;

— riferimenti a dati storici del modello, che includono (elenco non esaustivo): accettabilità dei dati di QC rispetto ai dati storici del lotto;

— dimostrazione della competenza nell'esecuzione del metodo di prova prima del suo uso sistematico testando le sostanze di prova a fini di competenza.

Procedura di prova:

— descrizione dettagliata della procedura sperimentale utilizzata (incluse le procedure di lavaggio utilizzate dopo il periodo di esposizione);

— dosi della sostanza chimica in esame e delle sostanze chimiche di controllo utilizzate;

— durata del o dei periodi di esposizione e temperatura/temperature di esposizione;

— indicazione dei controlli usati per riduttori dell'MTT diretti e/o sostanze chimiche di prova coloranti, se del caso;

— numero delle repliche di tessuti utilizzate per sostanza chimica in esame e sostanza di controllo (controllo positivo, controllo negativo e NSMTT, NSC_{living} e NSC_{killed}, se del caso), per tempo di esposizione;

— descrizione dei criteri decisionali/modello predittivo applicati in funzione del modello di RhE utilizzato;

— descrizione di tutte le modifiche apportate alla procedura sperimentale (incluso alle procedure di lavaggio).

Criteri di accettabilità della prova e della batteria di prove:

— valori medi del controllo positivo e negativo e intervalli di accettazione in funzione dei dati storici;

— variabilità accettabile tra le repliche di tessuti per i controlli positivi e negativi;

— variabilità accettabile tra le repliche di tessuti per sostanza chimica in esame.

Risultati:

— presentazione sotto forma di tabella dei dati delle singole sostanze chimiche in esame e dei singoli controlli, per ogni periodo di esposizione, ogni batteria di prove e ogni misurazione delle repliche, inclusi la OD o l'area di picco dell'MTT formazan, la percentuale di vitalità tessutale, la percentuale media di vitalità tessutale, le differenze tra repliche, le deviazioni standard e/o i coefficienti di variazione, se del caso;

— se del caso, i risultati dei controlli utilizzati per i riduttori diretti dell'MTT e/o per le sostanze chimiche in esame coloranti, inclusi la OD o l'area di picco dell'MTT formazan, %NSMTT, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, le differenze tra repliche di tessuti, le deviazioni standard e/o i coefficienti di variazione (se del caso) e la percentuale finale corretta di vitalità tessutale;

— i risultati ottenuti con la o le sostanze chimiche in esame in rapporto ai criteri di accettabilità della prova e della batteria di prove definiti;

— descrizione di altri effetti osservati;

— risultante classificazione con riferimento al modello predittivo/ai criteri decisionali utilizzati.

Discussione dei risultati

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

(1) UN (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva. Disponibile qui: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) Capitolo B.4 del presente allegato, Irritazione/corrosione cutanea acuta.

(3) Capitolo B.40 del presente allegato, Corrosione cutanea *in vitro*: metodo di prova della resistenza elettrica transcutanea (TER).

(4) Capitolo B.65 del presente allegato, Metodo di prova *in vitro* con membrana impermeabile per la corrosione cutanea.

(5) Capitolo B.46 del presente allegato, Irritazione cutanea *in vitro*: metodo di prova su un modello di epidermide umana ricostituita.

(6) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.*ATLA* 23:219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol.In Vitro* 12:471-482.

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhutter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for SkinCorrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicol.in Vitro 12:483-524.

(10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. and Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371-401.

(11) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, ATLA 23:129-147.

(12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological TestMethods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(14) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 March 2000.

(16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol.In Vitro* 19: 925-929.

(17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann,H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N, Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., and Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol.In Vitro* 20: 547-559.

(18) Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0,5 cm^2 Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379-1385.

(19) EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 November 2006.

(20) EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12 June 2009.

(21) OECD (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 190). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(22) Alépée N., Grandidier M.H., and Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28:131-145.

(23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., and Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29:2055-2080.

(24) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(25) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(26) Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62:393-403.

(27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.

(28) Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro*. In: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier A.,. Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133-140.

(29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol.in Vitro* 8:889 - 891.

(30) Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J and Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. Inter. J. Pharmaceu. 203:211 - 225.

(31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. and Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310-319.

(32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS and Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163-171.

(33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF and Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8:747-756.

(34) EpiSkin™ SOP (December 2011). *INVITTOX* Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.

(35) EpiDerm™ SOP (February 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.

(36) SkinEthic™ RHE SOP (January 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.

(37) EpiCS® SOP (January 2012). Version 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems.

(38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., and McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29: 741-761.

(39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (May 2001). Disponibile qui: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

Appendice 1

DEFINIZIONI

Accuratezza: grado di concordanza tra i risultati ottenuti con il metodo di prova e i valori di riferimento accettati. Misura l'efficienza del metodo di prova e costituisce un aspetto della pertinenza. Il termine è spesso utilizzato come sinonimo di "concordanza" per indicare la percentuale di risultati corretti di un metodo di prova (25).

Vitalità cellulare: parametro che misura l'attività totale in una popolazione di cellule, ad esempio la capacità delle deidrogenasi mitocondriali cellulari di ridurre il colorante vitale MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ile)-2,5-difeniltetrazolio bromuro, tiazolil blu) che, in funzione dell'endpoint misurato e del tipo di disegno sperimentale utilizzato, corrisponde al numero totale e/o alla vitalità delle cellule viventi.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Concordanza: misura dell'efficacia del metodo di prova per metodi che forniscono un risultato ordinabile in categorie e rappresenta un aspetto della pertinenza. Il termine è usato come sinonimo di "accuratezza" ed è definito come la proporzione di tutte le sostanze chimiche in esame che sono correttamente classificate come positive o negative. La concordanza dipende strettamente dalla prevalenza di risultati positivi in tutti i tipi di sostanze chimiche esaminate (25).

ET_{50}: valore che può essere calcolato determinando il tempo di esposizione necessario per ridurre la vitalità cellulare del 50 % in seguito all'applicazione della sostanza chimica di riferimento ad una concentrazione specifica e fissa; cfr. anche IC_{50}.

Sistema globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (UN GHS): sistema di classificazione delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) secondo tipi e livelli standardizzati di rischio fisico, sanitario e ambientale, che elabora i relativi elementi di comunicazione, quali pittogrammi, avvertenze, indicazioni di pericolo, consigli di prudenza e schede informative di sicurezza, per trasmettere informazioni sugli effetti avversi di dette sostanze a tutela delle persone (compresi datori di lavoro, lavoratori, trasportatori, consumatori e personale di pronto intervento) e dell'ambiente (1).

HPLC: cromatografia liquida ad alta prestazione.

IATA: approcci integrati in materia di prove e valutazioni (*Integrated Approaches to Testing and Assessment*).

IC_{50}: valore che può essere calcolato per determinazione della concentrazione alla quale una sostanza chimica di riferimento riduce la vitalità dei tessuti del 50 % (IC_{50}) dopo un tempo di esposizione fisso, cfr. anche ET_{50}.

Dose infinita: quantità di sostanza chimica in esame applicata all'epidermide che supera la quantità necessaria per coprire in maniera completa e uniforme la superficie dell'epidermide.

Miscela: miscela o soluzione composta da due o più sostanze non reagenti.

Sostanza monocostituente: sostanza, definita attraverso la sua composizione quantitativa, in cui un costituente principale è presente in percentuale pari ad almeno l'80 % (p/p).

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ile)-2,5-difeniltetrazolio bromuro; tiazolil blu tetrazolio bromuro

Sostanza multicostituente: una sostanza, definita attraverso la sua composizione quantitativa, in cui più costituenti principali sono presenti in concentrazione ≥ 10 % (p/p) e < 80 % (p/p). Una sostanza multicostituente è il risultato di un processo di fabbricazione. La differenza tra miscela e sostanza multicostituente è che una miscela è ottenuta attraverso la miscelazione di due o più sostanze senza che avvenga una reazione chimica. Una sostanza multicostituente è il risultato di una reazione chimica.

NC: non corrosivo.

Controllo NSC_{killed}: controllo del colore non specifico in tessuti uccisi.

Controllo NSC_{living}: controllo del colore non specifico in tessuti vivi.

NSMTT: riduzione non specifica dell'MTT.

OD: densità ottica.

PC: controllo positivo, una replica che contiene tutti i componenti di un sistema di prova e che è trattato con una sostanza chimica che notoriamente induce una reazione positiva. Perché sia possibile valutare la variabilità nel tempo della risposta del controllo positivo, l'intensità di tale risposta non dovrebbe essere eccessiva.

Standard di prestazione: standard, basati su un metodo di riferimento validato, che consentono di valutare la comparabilità di un metodo proposto che è simile sotto il profilo strutturale e funzionale. Detti standard comprendono: i) gli elementi essenziali del metodo di prova; ii) un elenco minimo di sostanze chimiche di riferimento scelte tra le sostanze utilizzate per dimostrare le prestazioni accettabili del metodo di prova validato; e iii) in funzione dei risultati ottenuti con il metodo di riferimento validato, i livelli comparabili di affidabilità e accuratezza che il metodo proposto dovrebbe ottenere quando viene valutato utilizzando l'elenco minimo di sostanze di riferimento (25).

Pertinenza: descrizione del rapporto tra la prova e l'effetto studiato; indica se la prova è significativa e utile per uno scopo specifico. È il grado con cui la prova misura o prevede correttamente l'effetto biologico di interesse. La pertinenza comprende una valutazione dell'accuratezza (concordanza) di una prova (25).

Affidabilità: misura in cui l'esecuzione di un metodo di prova può essere riprodotta nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi seguendo il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità intra-laboratorio e inter-laboratori (25).

Batteria di prove: una batteria di prove consiste nel testare una o più sostanze chimiche in esame simultaneamente a un controllo negativo e a un controllo positivo.

Sensibilità: proporzione di tutte le sostanze chimiche positive/attive correttamente classificate dal metodo di prova. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di un metodo di prova (25).

Corrosione cutanea *in vivo*: il manifestarsi di lesioni irreversibili della pelle, vale a dire, necrosi visibile dell'epidermide e del derma, a seguito dell'applicazione della sostanza chimica di prova per non più di quattro ore. Gli effetti tipici della corrosione sono ulcere, sanguinamento, croste sanguinolente e, al termine di un periodo di osservazione di 14 giorni, depigmentazione cutanea dovuta all'effetto sbiancante, chiazze di alopecia e cicatrici. Per valutare le lesioni dubbie potrebbe essere necessario ricorrere a un esame istopatologico.

Specificità: proporzione di tutte le sostanze chimiche negative/inattive correttamente classificate dal metodo di prova. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di un metodo (25).

Sostanza: un elemento chimico e i suoi composti, allo stato naturale od ottenuti per mezzo di un procedimento di fabbricazione, compresi gli additivi necessari a mantenerne la stabilità e le impurezze derivanti dal procedimento utilizzato, ma esclusi i solventi che possono essere separati senza compromettere la stabilità della sostanza o modificarne la composizione.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata applicando il presente metodo di prova.

UPLC: cromatografia liquida ad altissima prestazione.

UVCB: sostanze la cui composizione non è conosciuta o è variabile, prodotti di una reazione complessa o i materiali origine biologica.

Appendice 2

PRINCIPALI COMPONENTI DEI MODELLI DI PROVA SU RHE VALIDATI PER LE PROVE DELLA CORROSIONE CUTANEA

Componenti del modello di prova	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Superficie del modello	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Numero delle repliche di tessuto	Almeno due per tempo di esposizione	2-3 per tempo di esposizione	Almeno due per tempo di esposizione	Almeno due per tempo di esposizione
Dosi di trattamento e applicazione	Sostanze liquide e viscose: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm^2) Solidi: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 µl ± 5µl di soluzione NaCl (9 g/l) Sostanze cerose/appiccicose: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) con rete di nylon	Liquidi: 50 µl (79,4 µl/cm^2) con o senza rete di nylon *Compatibilità pre-prova della sostanza chimica in esame con rete di nylon* Semisolidi: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Solidi: 25 µl H_2O (o più se necessario) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Cere: disco piatto di circa 8 mm di diametro posizionato sopra il tessuto inumidito con 15 µl di H_2O.	Sostanze liquide e viscose: 40 µl ± 3µl (80 µl/cm^2) con rete di nylon *Compatibilità pre-prova della sostanza chimica in esame con rete di nylon* Solidi: 20 µl ± 2µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Sostanze cerose/appiccicose: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) con rete di nylon	Liquidi: 50 µl (83,3 µl/cm^2) con rete di nylon *Compatibilità pre-prova della sostanza chimica in esame con rete di nylon* Semisolidi: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Solidi: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (o più se necessario) Sostanze cerose: disco piatto di circa 8 mm di diametro posizionato sopra il tessuto inumidito con 15 µl di H_2O.

Componenti del modello di prova	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Pre-verifica della riduzione diretta dell'MTT	50 µl (liquidi) o 20 mg (solidi)+ 2 ml di MTT 0,3 mg/ml di soluzione per 180 ± 5 min a 37 °C, 5 % CO_2, 95 % UR → se la soluzione diventa blu/viola, eseguire controlli adattati su tessuti uccisi in acqua	50 µl (liquidi) o 25 mg (solidi)+ 1 ml di MTT 1 mg/ml di soluzione per 60 min a 37 °C, 5 % CO_2, 95 % UR → se la soluzione diventa blu/viola, eseguire controlli adattati su tessuti uccisi per congelamento	40 µl (liquidi) o 20 mg (solidi)+ 1 ml di MTT 1 mg/ml di soluzione per 180 ± 15 min a 37 °C, 5 % CO_2, 95 % UR → se la soluzione diventa blu/viola, eseguire controlli adattati su tessuti uccisi per congelamento	50 µl (liquidi) o 25 mg (solidi)+ 1 ml di MTT 1 mg/ml di soluzione per 60 min a 37 °C, 5 % CO_2, 95 % UR → se la soluzione diventa blu/viola, eseguire controlli adattati su tessuti uccisi per congelamento
Pre-verifica dell'interferenza del colore	10 µl (liquidi) o 10 mg (solidi) + 90 µl H_2O miscelata per 15 min a temperatura ambiente → se la soluzione si colora, eseguire controlli adattati su tessuti vivi	50 µl (liquidi) o 25 mg (solidi) + 300 µl H_2O per 60 min a 37 °C, 5 % CO_2, 95 % UR → se la soluzione si colora, eseguire controlli adattati su tessuti vivi	40 µl (liquidi) o 20 mg (solidi) + 300 µl H_2O miscelata per 60 min a temperatura ambiente → se la sostanza chimica in esame è colorata, eseguire controlli adattati su tessuti vivi	50 µl (liquidi) o 25 mg (solidi) + 300 µl H_2O per 60 min a 37 °C, 5 % CO_2, 95 % UR → se la soluzione si colora, eseguire controlli adattati su tessuti vivi
Temperatura e tempo di esposizione	3 min, 60 min (± 5 min) e 240 min (± 10 min) in armadio ventilato a temperatura ambiente (TA, 18-28 °C)	3 min a TA, e 60 min a 37 °C, 5 % CO_2, 95 % UR	3 min a TA, e 60 min a 37 °C, 5 % CO_2, 95 % UR	3 min a TA, e 60 min a 37 °C, 5 % CO_2, 95 % UR
Risciacquo	25 ml 1x PBS (2 ml/risciacquo)	20 volte con un getto delicato e costante di PBS 1x	20 volte con un getto delicato e costante di PBS 1x	20 volte con un getto delicato e costante di PBS 1x

Componenti del modello di prova	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Controllo negativo	50 µl di soluzione NaCl (9 g/l) Testato per ogni tempo di esposizione	50 µl di H_2O Testato per ogni tempo di esposizione	40 µl di H_2O Testato per ogni tempo di esposizione	50 µl di H_2O Testato per ogni tempo di esposizione
Controllo positivo	50 µl di acido acetico glaciale Testato solo per 4 ore	50 µl di 8N KOH Testato per ogni tempo di esposizione	40 µl di 8N KOH Testato solo per 1 ora	50 µl di 8N KOH Testato per ogni tempo di esposizione
Soluzione MTT	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Temperatura e tempo di incubazione dell'MTT	180 min (± 15 min) a 37 °C, 5 % CO_2, 95 % UR	180 min a 37 °C, 5 % CO_2, 95 % UR	180 min (± 15 min) a 37 °C, 5 % CO_2, 95 % UR	180 min a 37 °C, 5 % CO_2, 95 % UR
Solvente di estrazione	500 µl di isopropanolo acidificato (0,04 N HCl in isopropanolo) (tessuto isolato completamente immerso)	2 ml di isopropanolo (estrazione da sopra e sotto l'inserto)	1,5 ml di isopropanolo (estrazione da sopra e sotto l'inserto)	2 ml di isopropanolo (estrazione da sopra e sotto l'inserto)
Temperatura e tempo di estrazione	A TA per una notte, al riparo dalla luce	Per una notte senza agitare a TA o per 120 min agitando (~120 rpm) a TA	Per una notte senza agitare a TA o per 120 min agitando (~120 rpm) a TA	Per una notte senza agitare a TA o per 120 min agitando (~120 rpm) a TA

Componenti del modello di prova	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Lettura della OD	570 nm (545 - 595 nm) senza filtro di riferimento	570 nm (o 540 nm) senza filtro di riferimento	570 nm (540 - 600 nm) senza filtro di riferimento	540 - 570 nm senza filtro di riferimento
Controllo di qualità dei tessuti	trattamento di 18 ore con SDS 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	Trattamento con Triton X-100 all'1 % 4,08 ore ≤ ET_{50} ≤ 8,7 ore	Trattamento con Triton X-100 all'1 % 4,0 ore ≤ ET_{50} ≤ 10,0 ore	Trattamento con Triton X-100 all'1 % 2,0 ore ≤ ET_{50} ≤ 7,0 ore
Criteri di accettabilità	1. La densità ottica media delle repliche di tessuto trattate con il controllo negativo (NaCl) è ≥ 0,6 e ≤ 1,5 per ogni tempo di esposizione 2. La vitalità media delle repliche di tessuto esposte per 4 ore al controllo positivo (acido acetico glaciale), espressa come % del controllo negativo, è ≤ 20 % 3. Nell'intervallo di vitalità 20-100 % e con OD ≥ 0,3, la differenza di vitalità tra le due repliche di tessuto non supera il 30 %	1. La densità ottica media delle repliche di tessuto trattate con il controllo negativo (H_2O) è ≥ 0,8 e ≤ 2,8 per ogni tempo di esposizione 2. La vitalità media delle repliche di tessuto esposte per 1 ora al controllo positivo (8N KOH), espressa come % del controllo negativo, è < 15 % 3. Nell'intervallo di vitalità 20-100 %, il coefficiente di variazione (CV) tra le repliche di tessuto è ≤ 30 %	1. La densità ottica media delle repliche di tessuto trattate con il controllo negativo (H_2O) è ≥ 0,8 e ≤ 3,0 per ogni tempo di esposizione 2. La vitalità media delle repliche di tessuto esposte per 1 ora (e 4 ore se del caso) al controllo positivo (8N KOH), espressa come % del controllo negativo, è < 15 % 3. Nell'intervallo di vitalità 20-100 % e con OD ≥ 0,3, la differenza di vitalità tra le due repliche di tessuto non supera il 30 %	1. La densità ottica media delle repliche di tessuto trattate con il controllo negativo (H_2O) è ≥ 0,8 e ≤ 2,8 per ogni tempo di esposizione 2. La vitalità media delle repliche di tessuto esposte per 1 ore al controllo positivo (8N KOH), espressa come % del controllo negativo, è < 20 % 3. Nell'intervallo di vitalità 20-100 % e con OD ≥ 0,3, la differenza di vitalità tra le due repliche di tessuto non supera il 30 %

Appendice 3

PRESTAZIONI DEI MODELLI DI PROVA AI FINI DELLA SOTTOCATEGORIZZAZIONE

La tabella che segue descrive i risultati dei quattro modelli di prova calcolati a partire da una serie di 80 sostanze chimiche testate dai quattro sviluppatori delle prove. I calcoli sono stati svolti dal segretariato dell'OCSE, poi rivisti e approvati da un sottogruppo di esperti (21) (23).

I modelli di prova EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ e epiCS® consentono la sottocategorizzazione (cat. 1A vs 1B-e-1C vs NC).

Prestazioni, tassi di sovraclassificazione, tassi di sottoclassificazione, e accuratezza (capacità predittiva) dei quattro modelli di prova a partire da una serie di 80 sostanze chimiche, tutte testate su 2 o 3 batterie di prova in ciascun modello di prova.

STATISTICHE RELATIVE ALLE PREVISIONI OTTENUTE SULL'INTERA SERIE DI SOSTANZE CHIMICHE

(n = 80 sostanze chimiche testate in due batterie di prove indipendenti per epiCS® o in 3 batterie di prove indipendenti per EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ e SkinEthic™ RHE, ossia rispettivamente 159 (*) o 240 classificazioni)

	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Sovraclassificazioni:				
Sostanze di cat. 1B-e-1C sovraclassificate come di cat. 1A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
Sostanze non corrosive sovraclassificate come di cat. 1B-e-1C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
Sostanze non corrosive sovraclassificate come di cat. 1A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Sostanze non corrosive sovraclassificate come corrosive	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Tasso globale di sovraclassificazione (tutte le categorie)	**17,9 %**	**23,3 %**	**24,5 %**	**25,8 %**
Sottoclassificazioni:				
Sostanze di cat. 1A sottoclassificate come di cat. 1B-e-1C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
Sostanze di cat. 1A sottoclassificate come non corrosive	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
Sostanze di cat. 1B-e-C sottoclassificate come non corrosive	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Tasso globale di sottoclassificazione (tutte le categorie)	**3,3 %**	**2,5 %**	**5,4 %**	**4,4 %**
Classificazioni corrette:				
Sostanze di cat. 1A correttamente classificate	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
Sostanze di cat. 1B-e-1C correttamente classificate	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
Sostanze non corrosive correttamente classificate	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Accuratezza generale	**78,8 %**	**74,2 %**	**70 %**	**69,8 %**

NC: sostanza chimica non corrosiva

(*) Una sostanza chimica è stata testata una sola volta per epiCS® perché non era disponibile (23)

Appendice 4

Criteri di accettabilità e parametri fondamentali per la qualificazione di un sistema di spettrofotometria HPLC/UPLC per misurare l'MTT formazan estratto da un tessuto di RhE

Parametro	Protocollo derivato dalle raccomandazioni della *Food and Drug Administration* (37) (38)	Criteri di accettabilità
Selettività	Analisi di isopropanolo, bianco vivo (isopropanolo estratto da tessuti di RhE vivi non trattati), bianco morto (isopropanolo estratto da tessuti di RhE uccisi non trattati)	$Area_{interferenza}$ ≤ 20 % di $Area_{LLOQ}$ [1]
Precisione	Controlli di qualità (ossia MTT formazan a 1,6 µg/ml, 16 µg/ml e 160 µg/ml) in isopropanolo (n=5)	CV ≤ 15 % o ≤ 20 % per il LLOQ
Accuratezza	Controlli di qualità in isopropanolo (n=5)	% Dev ≤ 15 % o ≤ 20 % per LLOQ
Effetto matrice	Controlli di qualità in bianco vivo (n=5)	85 % ≤ effetto matrice % ≤ 115 %
Effetto residuale	Analisi dell'isopropanolo dopo un $ULOQ^2$ standard [2]	$Area_{interferenza}$ ≤ 20 % di $Area_{LLOQ}$
Riproducibilità (nella giornata)	3 curve di taratura indipendenti (sulla base di 6 diluizioni consecutive a 1/3 di MTT formazan in isopropanolo, cominciando a ULOQ, ossia a 200 µg/ml); Controlli di qualità in isopropanolo (n=5)	Curve di taratura: % Dev ≤ 15 % o ≤ 20 % per LLOQ Controlli di qualità: %Dev ≤ 15 % e CV ≤ 15 %
Riproducibilità (tra un giorno e l'altro)	Giorno 1: 1 curva di taratura e controlli di qualità in isopropanolo (n=3) Giorno 2: 1 curva di taratura e controlli di qualità in isopropanolo (n=3) Giorno 3: 1 curva di taratura e controlli di qualità in isopropanolo (n=3)	
Stabilità a breve termine dell'MTT formazan in un estratto di tessuto RhE	Controlli di qualità in bianco vivo (n=3) analizzati il giorno della preparazione e dopo 24 ore di conservazione a temperatura ambiente	%Dev ≤ 15 %
Stabilità a lungo termine dell'MTT formazan in un estratto di tessuto RhE, se necessario	Controlli di qualità in bianco vivo (n=3) analizzati il giorno della preparazione e dopo diversi giorni di conservazione alle temperature specificate (ossia 4 °C, -20 °C, -80 °C)	%Dev ≤ 15 %

[1] LLOQ: limite inferiore di quantificazione (*Lower Limit of Quantification*), definito per coprire l'1-2 % di vitalità tessutale, ossia 0,8 µg/ml
[2] ULOQ: limite superiore di quantificazione (*Upper Limit of Quantification*), definito per essere almeno due volte superiore alla concentrazione massima di MTT formazan prevista negli estratti di isopropanolo dei controlli negativi, ossia 200 µg/ml."

7) Nella parte B, il capitolo B.46 è sostituito dal seguente:

"B.46 **IRRITAZIONE CUTANEA IN VITRO: METODO DI PROVA SU UN MODELLO DI EPIDERMIDE UMANA RICOSTITUITA**

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 439 (2015). Per irritazione cutanea si intende la comparsa di lesioni reversibili della pelle in seguito all'applicazione della sostanza chimica in esame per un massimo di 4 ore [secondo la definizione del Sistema globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (UN GHS) (1) e del regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele (CLP) ([1])]. Il presente metodo di prova propone una procedura *in vitro* che può essere utilizzata per individuare i pericoli connessi alle sostanze chimiche irritanti (sostanze e miscele) conformemente alla categoria 2 del GHS dell'ONU e del regolamento CLP (2). Nelle regioni che non adottano la categoria opzionale 3 del GHS dell'ONU (lievi irritanti), il presente metodo di prova può essere impiegato anche per individuare sostanze chimiche non classificate. Pertanto, a seconda del quadro normativo e del sistema di classificazione in uso, il presente metodo di prova può essere usato per determinare il potere di irritazione cutanea delle sostanze chimiche e costituire una prova a sé stante in sostituzione della prova di irritazione cutanea *in vivo* o una prova sostitutiva parziale nel quadro di una strategia di sperimentazione (3).
2. Tradizionalmente, la valutazione dell'irritazione cutanea è effettuata su animali da esperimento (metodo di prova B.4 equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 404 originariamente adottata nel 1981 e rivista nel 1992, nel 2002 e nel 2015) (4). Per testare la corrosività tre metodi di prova *in vitro* validati sono stati adottati come metodi di prova dell'UE: B.40 (equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 430), B.40 *bis* (equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 431) e B.65 (equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 435) (5) (6) (7). Un documento di orientamento dell'OCSE relativo agli approcci integrati in materia di prove e valutazioni (IATA – *Integrated Approaches to Testing and Assessment*) per la corrosione e l'irritazione cutanea descrive diversi moduli che raggruppano fonti di informazione e strumenti di analisi, e i) fornisce orientamenti su come integrare e utilizzare i dati sperimentali e non sperimentali esistenti per valutare il potenziale di irritazione cutanea e di corrosione cutanea delle sostanze chimiche e ii) propone un approccio quando occorrono prove ulteriori (3).
3. Il presente metodo di prova riguarda l'endpoint per la salute umana dell'irritazione cutanea. Esso si fonda sul sistema di prova *in vitro* che utilizza un'epidermide umana ricostituita (*reconstructed human epidermis* – RhE) che riproduce fedelmente le proprietà biochimiche e fisiologiche degli strati superiori della pelle umana (l'epidermide). Il sistema di prova su RhE utilizza cheratinociti non trasformati derivati da epidermide umana come fonte cellulare per ricostituire un modello di epidermide dotato di citoarchitettura e istologia rappresentative. Sono disponibili standard di prestazione per facilitare la validazione e la valutazione di metodi di prova su RhE simili e modificati, conformemente ai principi contenuti nel documento di orientamento dell'OCSE n. 34 (8) (9). La linea guida dell'OCSE corrispondente è stata originariamente adottata nel 2010 e aggiornata nel 2013 al fine di includere modelli di RhE supplementari, ed è stata poi aggiornata nel 2015 per richiamare il documento di orientamento IATA e introdurre l'uso di una procedura alternativa per misurare la vitalità.
4. Gli studi di prevalidazione, ottimizzazione e validazione sono stati completati per quattro modelli di prova *in vitro* disponibili sul mercato (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28), basati sul sistema di prova su RhE (sensibilità 80 %, specificità 70 % e accuratezza 75 %). I quattro modelli di prova sono inclusi nel presente saggio ed elencati nell'appendice 2, che fornisce inoltre informazioni sul tipo di studio di validazione usato per validare i rispettivi metodi di prova. Come precisato nell'appendice 2, il metodo di riferimento validato (VRM) è stato utilizzato per sviluppare il presente metodo di prova e gli standard di prestazione (8).
5. L'applicazione del sistema dell'OCSE di reciproca accettazione dei dati sarà garantita per i modelli di prova validati in conformità agli standard di prestazione (8) solo se tali modelli di prova sono stati rivisti e adottati dall'OCSE. I modelli di prova inclusi nel presente metodo di prova e le corrispondenti linee guida dell'OCSE possono essere utilizzati indiscriminatamente per rispondere alle prescrizioni dei paesi relative ai risultati sperimentali dei metodi di prova *in vitro* intesi a determinare l'irritazione cutanea, traendo al tempo stesso vantaggio dalla reciproca accettazione dei dati.
6. L'appendice 1 contiene le definizioni dei termini utilizzati.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

7. Uno dei limiti del metodo di prova, evidenziato anche dal comprensivo studio prospettico di validazione che valuta e caratterizza i metodi di prova su RhE (16), è che esso non consente di classificare le sostanze chimiche nella categoria opzionale 3 del sistema GHS dell'ONU (lievi irritanti) (1). Pertanto il quadro normativo applicabile negli Stati membri stabilirà in che modo il presente metodo di prova sarà utilizzato. Per l'UE, la categoria 3 non è stata inclusa nel regolamento CLP. Per una valutazione completa degli effetti cutanei locali a seguito di una singola esposizione della pelle, si raccomanda di consultare il documento di orientamento dell'OCSE relativo agli approcci integrati in materia di prove e valutazioni (IATA) (3). È noto che l'utilizzo di pelle umana è oggetto di considerazioni etiche e soggetto a condizioni nazionali ed internazionali.

([1]) Regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2008, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006 (GU L 353 del 31.12.2008, pag. 1).

8. Il presente metodo di prova riguarda l'endpoint per la salute umana dell'irritazione cutanea. Se da un lato il metodo non fornisce informazioni adeguate sulla corrosione cutanea, è opportuno notare che il metodo B.40 *bis* (equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 431) sulla corrosione cutanea si fonda sul medesimo sistema di prova su epidermide umana ricostituita, avvalendosi tuttavia di un diverso protocollo (6). Il metodo di prova in esame si basa su modelli di RhE che utilizzano cheratinociti umani e riproducono pertanto *in vitro* l'organo bersaglio della specie di interesse. Oltretutto, esso riguarda direttamente la fase iniziale della cascata infiammatoria/meccanismo d'azione (i danni a cellule e tessuti causano un trauma localizzato) che si verifica durante l'irritazione *in vivo*. Ai fini della validazione del metodo di prova in questione è stata sottoposta a prova un'ampia gamma di sostanze chimiche e la banca dati relativa allo studio di validazione contava un totale di 58 sostanze chimiche (16) (18) (23). Il metodo di prova è applicabile a solidi, liquidi, semisolidi e cere. I liquidi possono essere acquosi o non acquosi, i solidi possono essere solubili o insolubili in acqua. Quando possibile, prima dell'applicazione i solidi dovrebbero essere frantumati in polvere fine; non sono necessarie altre forme di pretrattamento del campione. I gas e gli aerosol non sono stati ancora valutati nell'ambito di uno studio di validazione (29). Benché sia ipotizzabile che essi possano essere testati utilizzando la tecnologia RhE, l'attuale metodo di prova non prevede l'esecuzione di prove per gas e aerosol.

9. Prima di applicare il presente metodo di prova a una miscela per generare dati ai fini regolamentari previsti, si deve considerare se, e in caso affermativo perché, esso possa fornire risultati adeguati a tale scopo. Tali considerazioni non sono necessarie laddove esista una disposizione normativa che obblighi a sottoporre a prova la miscela. Tuttavia, poiché le miscele coprono un ampio spettro di categorie e composizioni e tenuto conto delle informazioni limitate attualmente disponibili circa la sperimentazione sulle miscele, nei casi in cui sia possibile dimostrare che il metodo di prova non è applicabile a una categoria specifica di miscele (ad esempio applicando una strategia come proposto da Eskes *et al.*, 2012 (30)) non si deve utilizzare il metodo di prova per tale categoria specifica di sostanze. Analogamente occorre prestare attenzione nel caso in cui si riscontri che specifiche classi chimiche o proprietà fisico-chimiche non siano applicabili al metodo di prova in questione.

10. Le sostanze chimiche in esame che assorbono la luce nello stesso spettro dell'MTT formazan e le sostanze chimiche in esame in grado di ridurre direttamente il colorante vitale MTT (in MTT formazan) possono interferire con le misurazioni di vitalità cellulare e richiedono l'utilizzo di controlli adattati per correggere tali interferenze (cfr. i paragrafi da 28 a 34).

11. Una singola batteria di prove costituita da tre repliche di tessuti è sufficiente per una sostanza chimica in esame, se la classificazione è inequivocabile. Tuttavia, in caso di risultati ambigui, tra cui misurazioni discordanti delle repliche e/o una vitalità percentuale media pari a 50 ± 5 %, si dovrebbe considerare l'opportunità di eseguire una seconda batteria di prove, oltre che una terza nell'eventualità di risultati discordanti tra le prime due.

PRINCIPIO DELLA PROVA

12. La sostanza chimica in esame viene applicata localmente ad un modello tridimensionale di epidermide umana ricostituita, composta da cheratinociti non trasformati prelevati da epidermide umana, messi in coltura per formare un modello multistrato, altamente differenziato, di epidermide umana. Il modello è costituito da uno strato basale, uno strato spinoso e uno strato granuloso organizzati e da uno strato corneo multiplo contenente strati di strutture lamellari lipidiche intercellulari rappresentanti le principali classi lipidiche analoghe a quelle presenti *in vivo*.

13. L'irritazione cutanea indotta dalle sostanze chimiche, manifestata principalmente da eritema ed edema, scaturisce da una cascata di eventi che iniziano con la penetrazione delle sostanze chimiche nello strato corneo, dove provocano lesioni ai sottostanti strati di cheratinociti e ad altre cellule epiteliali. Le cellule danneggiate possono rilasciare mediatori dell'infiammazione o scatenare la cascata infiammatoria che agisce anche sulle cellule del derma, in particolare sulle cellule stromali ed endoteliali dei vasi sanguigni. Sono la dilatazione e l'accresciuta permeabilità delle cellule endoteliali a produrre l'eritema e l'edema osservati (29). In particolare, in mancanza di vascolarizzazione nel sistema di prova *in vitro*, i metodi di prova su RhE misurano gli eventi iniziali della cascata, ossia i danni cellulari/dei tessuti (16) (17), rilevando la vitalità cellulare.

14. La vitalità cellulare nei modelli di epidermide umana ricostituita è misurata tramite conversione enzimatica del colorante vitale MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-ile)-2,5-difeniltetrazolio bromuro, tiazolil blu; numero CAS 298-93-1], in un sale, il blu di formazan, misurato quantitativamente dopo l'estrazione dai tessuti (31). Le sostanze chimiche irritanti sono identificate dalla loro capacità di diminuire la vitalità cellulare al di sotto di determinati livelli soglia (ossia ≤ 50 %, per quelle appartenenti alla categoria 2 del sistema GHS delle Nazioni Unite/regolamento CLP). A seconda del quadro regolamentare e dell'applicabilità del metodo di prova, le sostanze chimiche in esame che danno vitalità cellulare superiore al livello soglia definito possono essere considerate non irritanti (ossia > 50 %, senza categoria).

DIMOSTRAZIONE DELLA COMPETENZA DI LABORATORIO

15. Prima di utilizzare correntemente uno qualsiasi dei quattro modelli di prova validati e conformi al presente metodo di prova (cfr. l'appendice 2), i laboratori dimostrano la loro competenza tecnica usando le dieci sostanze chimiche per la verifica della competenza tecnica di cui alla tabella 1. Nel caso in cui una sostanza in elenco non sia ad esempio disponibile, può essere utilizzata un'altra sostanza per la quale sono disponibili dati di riferimento *in vivo* e *in vitro* (ad esempio scegliendo dalla lista delle sostanze chimiche di riferimento (8)) a condizione che siano applicati i medesimi criteri di selezione di cui alla tabella 1. L'uso di una sostanza di prova a fini di competenza alternativa deve essere giustificato.
16. Nell'ambito della dimostrazione delle competenze, si raccomanda che l'utente si accerti delle proprietà di barriera dei tessuti dopo averli ricevuti, in conformità delle specifiche del produttore del modello di epidermide umana ricostituita. Tale verifica è particolarmente importante se i tessuti vengono trasportati per lunghe distanze/per viaggi lunghi. Quando un metodo di prova è consolidato e il suo uso corretto da parte del laboratorio è stato acquisito e dimostrato, non è più necessario effettuare la verifica in maniera sistematica. Tuttavia, se un metodo di prova viene sistematicamente utilizzato, si raccomanda di continuare a verificare le proprietà di barriera a intervalli regolari.

Tabella 1

Sostanze di prova ai fini della competenza ([1])

Sostanza	n. CAS	Punteggio *in vivo* ([2])	Stato fisico	Categoria GHS dell'ONU
SOSTANZE NON CLASSIFICATE (senza cat. nel GHS dell'ONU)				
Acido 1-naftalenacetico	86-87-3	0	solido	senza cat.
Isopropanolo	67-63-0	0,3	liquido	senza cat.
Stearato di metile	112-61-8	1	solido	senza cat.
Butirrato di eptile	5870-93-9	1,7	liquido	senza cat. (*cat. opzionale 3*) ([3])
Salicilato di esile	6259-76-3	2	liquido	senza cat. (*cat. opzionale 3*) ([3])
SOSTANZE CLASSIFICATE (categoria 2 del GHS dell'ONU)				
Aldeide ciclamenica	103-95-7	2,3	liquido	cat. 2
1-bromoesano	111-25-1	2,7	liquido	cat. 2
Idrossido di potassio (5 % acq.)	1310-58-3	3	liquido	cat. 2
1-metil-3-fenil-1-piperazina	5271-27-2	3,3	solido	cat. 2
Eptanale	111-71-7	3,4	liquido	cat. 2

([1]) Le sostanze di prova a fini di competenza sono un sottoinsieme delle sostanze usate nello studio di validazione e sono selezionate sulla base dei seguenti criteri: i) sono disponibili sul mercato; ii) sono rappresentative dell'intera gamma di punteggi di irritabilità di Draize (da non irritante a fortemente irritante); iii) hanno una struttura chimica ben definita; iv) sono rappresentative della funzionalità chimica usata nel processo di validazione; v) producono risultati *in vitro* riproducibili in varie prove e in vari laboratori; vi) sono state oggetto di previsioni *in vitro* corrette e vii) non sono associate ad un profilo estremamente tossico (ad esempio, cancerogeno o tossico per il sistema riproduttivo) e non comportano costi di smaltimento proibitivi.

([2]) Punteggio *in vivo* in conformità al metodo di prova B.4 (4).

([3]) Nell'ambito del presente metodo di prova, la categoria opzionale 3 del GHS dell'ONU (lievi irritanti) (1) è considerata una sostanza "senza categoria".

PROCEDURA

17. Di seguito sono descritte le componenti e le procedure di un metodo di prova su RhE per valutare l'irritazione cutanea (cfr. anche l'appendice 3 per i parametri relativi a ciascun modello di prova). Esistono procedure operative standard per i quattro modelli conformi al presente metodo di prova (32) (33) (34) (35).

COMPONENTI DEL METODO DI PROVA SU EPIDERMIDE UMANA RICOSTITUITA

Condizioni generali

18. Per ricostruire l'epitelio devono essere utilizzati cheratinociti non trasformati di origine umana. Devono essere presenti molteplici strati di cellule epiteliali vitali (strato basale, strato spinoso, strato granuloso) sotto uno strato corneo funzionale. Lo strato corneo deve presentare molteplici strati con il profilo lipidico necessario per costituire una barriera funzionale solida capace di resistere alla penetrazione rapida delle sostanze chimiche di riferimento citotossiche, ad esempio, sodio dodecil solfato (SDS) o Triton X-100. La funzione di barriera deve essere dimostrata e può essere valutata determinando la concentrazione alla quale una sostanza chimica di riferimento riduce la vitalità dei tessuti del 50 % (IC_{50}) dopo un tempo di esposizione fisso oppure determinando il tempo di esposizione necessario per ridurre la vitalità cellulare del 50 % (ET_{50}) dopo l'applicazione della sostanza chimica di riferimento a una concentrazione fissa predeterminata. Le proprietà di contenimento del modello di RhE devono essere tali da impedire il passaggio di materiale attorno allo strato corneo verso i tessuti vitali, che inciderebbe negativamente sulla qualità della modellizzazione dell'esposizione cutanea. Il modello di epidermide umana ricostituita non deve essere contaminato da batteri, virus, micoplasmi o funghi.

Condizioni funzionali

Vitalità

19. Per quantificare la vitalità si applica il test dell'MTT (31). Le cellule vitali del modello di RhE possono ridurre il colorante vitale MTT a un precipitato MTT blu di formazan che è successivamente estratto dal tessuto utilizzando isopropanolo (o un solvente analogo). La densità ottica (OD) del solo solvente di estrazione dovrebbe essere sufficientemente bassa, ossia OD < 0,1. L'MTT formazan estratto può essere quantificato utilizzando una misurazione di assorbanza standard (OD) o una procedura di spettrofotometria HPLC/UPLC (36). Gli utilizzatori del modello di RhE devono accertarsi che ciascun lotto del modello impiegato soddisfi i criteri definiti per il controllo negativo. È opportuno che lo sviluppatore/il fornitore del modello di RhE stabilisca un intervallo di accettabilità (limite superiore e inferiore) dei valori di OD del controllo negativo (nelle condizioni del metodo di prova dell'irritazione cutanea). L'intervallo di accettabilità per i quattro modelli di RhE inclusi nel presente metodo di prova è illustrato nella tabella 2. L'utilizzatore di spettrofotometria HPLC/UPLC applicherà gli intervalli di OD del controllo negativo di cui alla tabella 2 come criteri di accettabilità del controllo negativo. Occorre documentare che i tessuti trattati con il controllo negativo sono stabili in coltura (ossia presentano misurazioni di vitalità simili) per tutto il periodo di esposizione della prova.

Tabella 2

Intervalli di accettabilità dei valori di OD del controllo negativo dei modelli di prova inclusi nel presente metodo di prova

	Limite di accettabilità inferiore	Limite di accettabilità superiore
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Funzione di barriera

20. Lo strato corneo e la relativa composizione lipidica devono essere sufficienti per resistere alla penetrazione rapida di sostanze chimiche di riferimento citotossiche (come SDS o Triton X-100), valutata tramite i fattori IC_{50} o ET_{50} (tabella 3).

Morfologia

21. L'esame istologico del modello di RhE deve essere svolto in modo da dimostrare che la struttura è analoga a quella dell'epidermide umana (compreso lo strato corneo multiplo).

Riproducibilità

22. I risultati dei controlli positivi (PC) e negativi (NC) del metodo devono mostrare la riproducibilità nel tempo.

Controllo di qualità (QC)

23. Il modello di RhE è utilizzato solo se lo sviluppatore/fornitore dimostra che ogni lotto del modello utilizzato rispetta determinati criteri di fabbricazione, i più rilevanti dei quali riguardano la *vitalità* (paragrafo 19), la *funzione di barriera* (paragrafo 20) e la *morfologia* (paragrafo 21). Tali informazioni devono essere fornite agli utilizzatori del metodo, perché possano inserirle nella relazione di prova. Lo sviluppatore/il fornitore del modello di RhE stabilisce un intervallo di accettabilità (limite superiore e inferiore) per i valori di IC_{50} o di ET_{50}. Per una previsione affidabile degli effetti irritanti possono essere considerati accettabili solo i risultati ottenuti con tessuti corrispondenti ai criteri. Nella tabella 3 sono riportati gli intervalli di accettabilità per i quattro modelli di RhE inclusi nel presente metodo di prova.

Tabella 3

Criteri di controllo di qualità dei lotti dei modelli di prova inclusi nel metodo di prova

	Limite di accettabilità inferiore	Limite di accettabilità superiore
EpiSkin™ (SM) (trattamento di 18 ore con SDS) (32)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (33)	ET_{50} = 4,0 ore	ET_{50} = 8,7 ore
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 ore	ET_{50} = 10,0 ore
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (trattamento di 18 ore con SDS) (35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

Applicazione delle sostanze chimiche in esame e delle sostanze chimiche di controllo

24. Per ogni sostanza chimica in esame e per i controlli devono essere utilizzate almeno tre repliche di tessuto per batteria di prove. Per le sostanze chimiche sia liquide che solide occorre applicare una quantità sufficiente della sostanza in esame fino a coprire uniformemente la superficie dell'epidermide evitando nel contempo una dose infinita, ossia una quantità compresa tra 26 e 83 µl/cm^2 o mg/cm^2 (cfr. l'appendice 3). Per le sostanze solide, la superficie dell'epidermide deve essere inumidita con acqua deionizzata o distillata prima dell'applicazione, al fine di migliorare il contatto tra la sostanza sperimentale e la superficie dell'epidermide. Quando possibile, i solidi dovrebbero essere testati sotto forma di polvere fine. In alcuni casi è possibile usare una rete di nylon per agevolare l'applicazione (cfr. l'appendice 3). Al termine del periodo di esposizione, la sostanza di prova deve essere dilavata con cura dalla superficie dell'epidermide utilizzando un tampone acquoso o NaCl allo 0,9 %. Il periodo di esposizione varia tra 15 e 60 minuti e la temperatura di incubazione tra 20 e 37 °C in funzione del modello di RhE impiegato. I periodi di esposizione e le temperature sono messi a punto per ciascun metodo di prova su RhE e rappresentano le diverse proprietà intrinseche dei modelli di prova (come la funzione di barriera) (cfr. l'appendice 3).

25. Occorre utilizzare simultaneamente controlli negativi (NC) e controlli positivi (PC) per ogni batteria di prove al fine di dimostrare che la vitalità (nel caso del controllo negativo), la funzione di barriera e la conseguente sensibilità dei tessuti (nel caso del controllo positivo) rientrano in un intervallo di accettabilità storico determinato. Ai fini dei controlli positivi si consiglia una soluzione acquosa di SDS al 5 %. Ai fini dei controlli negativi si consigliano acqua o un tampone fosfato salino (PBS).

Misurazione della vitalità cellulare

26. Conformemente alla procedura sperimentale, è fondamentale che le misurazioni della vitalità non siano svolte immediatamente dopo l'esposizione alle sostanze chimiche in esame bensì dopo un periodo di incubazione post-trattamento sufficientemente lungo dei tessuti risciacquati in un mezzo fresco. Questo periodo consente sia il recupero da effetti citotossici blandi sia la comparsa di effetti citotossici evidenti. Un periodo di incubazione post-trattamento di 42 ore è stato valutato ottimale nella messa a punto della prova di due dei modelli di prova su RhE alla base del presente metodo di prova (11) (12) (13) (14) (15).

27. Il test dell'MTT è un metodo quantitativo validato per misurare la vitalità cellulare nell'ambito del presente metodo di prova. È compatibile con l'utilizzo di un modello tridimensionale di tessuto. Il campione di tessuto è immerso in una soluzione MTT alla concentrazione adeguata (0,3 o 1 mg/ml) per 3 ore. L'MTT è convertito in blu di formazan dalle cellule vitali. Il precipitato di blu di formazan che si forma è successivamente estratto dal tessuto con un solvente (ad esempio isopropanolo, isopropanolo acidico), e ne viene misurata la concentrazione o determinando la densità ottica a 570 nm con filtro passa-banda della larghezza massima di ± 30 nm o con una procedura di spettrofotometria HPLC/UPLC (cfr. il paragrafo 34) (36).

28. Le proprietà ottiche della sostanza chimica in esame o la sua azione chimica sull'MTT (la sostanza chimica può ad esempio impedire o invertire la generazione di colore o provocarla) può interferire con la prova e determinare un errore nella stima della vitalità. Questo può verificarsi quando una specifica sostanza chimica in esame non viene completamente rimossa dal tessuto con il risciacquo o quando penetra nell'epidermide. Se la sostanza in esame agisce direttamente sull'MTT (ad es. un riduttore dell'MTT), è naturalmente colorata o si colora durante il trattamento del tessuto, devono essere utilizzati controlli supplementari per individuare e correggere qualsiasi interferenza della sostanza in esame con la tecnica di misurazione della vitalità (cfr. i paragrafi 29 e 33). Per una descrizione dettagliata di come correggere la riduzione diretta dell'MTT e le interferenze da parte degli agenti coloranti consultare le procedure operative standard dei quattro modelli validati inclusi nel presente metodo di prova (32) (33) (34) (35).

29. Per individuare i riduttori diretti dell'MTT, aggiungere ciascuna sostanza chimica in esame alla soluzione contenente MTT appena preparata. Se la miscela di MTT contenente la sostanza chimica in esame diventa blu/viola, si presume che la sostanza chimica in esame sia un riduttore diretto dell'MTT e si esegue un ulteriore controllo funzionale sui tessuti non vitali dell'RhE, indipendentemente dall'uso della misurazione di assorbanza standard (OD) o di una procedura di spettrometria HPLC/UPLC. Tale controllo funzionale supplementare viene effettuato su tessuti uccisi che presentano solo un'attività metabolica residua ma assorbono la sostanza chimica in esame in modo analogo ai tessuti vitali. Ogni riduttore chimico dell'MTT è applicato su almeno due repliche di tessuti uccisi sottoposte all'intera procedura di prova per generare una riduzione non specifica dell'MTT (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Per ciascuna sostanza chimica in esame è sufficiente un unico controllo NSMTT, a prescindere dal numero di prove indipendenti/batterie di prove indipendenti eseguite. La reale vitalità del tessuto è poi calcolata come la percentuale di vitalità tessutale ottenuta con tessuti vivi esposti al riduttore dell'MTT meno la percentuale della riduzione non specifica dell'MTT ottenuta con i tessuti uccisi esposti al medesimo riduttore dell'MTT, calcolata in funzione della batteria di prove del controllo negativo testato in parallelo alla prova da correggere (% NSMTT).

30. Per individuare l'interferenza potenziale di sostanze chimiche in esame colorate o che si colorano a contatto con l'acqua o l'isopropanolo e stabilire la necessità di controlli supplementari, si esegue un'analisi dello spettro della sostanza chimica in esame nell'acqua (ambiente al momento dell'esposizione) e/o nell'isopropanolo (solvente di estrazione). Se la sostanza chimica in esame nell'acqua o nell'isopropanolo assorbe la luce nell'intervallo di 570 ± 30 nm, si procede con ulteriori controlli del colorante o, in alternativa, con una procedura di spettrofotometria HPLC/UPLC qualora tali controlli non siano necessari (cfr. i paragrafi 33 e 34). Nell'eseguire una misurazione dell'assorbanza standard (OD), ciascuna sostanza chimica in esame colorata che causa un'interferenza è applicata su almeno due repliche di tessuti vitali sottoposte all'intera procedura di prova, con la differenza che sono incubate in un mezzo anziché in una soluzione di MTT durante la fase di incubazione dell'MTT per generare un controllo del colore non specifico (NSC_{living}). Il controllo NSC_{living} deve essere eseguito parallelamente alla prova della sostanza chimica in esame colorata e nel caso di molteplici prove occorre svolgere un controllo NSC_{living} per ciascuna prova svolta (ogni batteria di prove) a causa della variabilità biologica intrinseca dei tessuti vivi. La reale vitalità del tessuto è poi calcolata come la percentuale della vitalità tessutale ottenuta con tessuti vivi esposti alla sostanza chimica in esame che provoca un'interferenza e incubati con la soluzione di MTT meno la percentuale di colore non specifico ottenuto con tessuti vivi esposti alla sostanza chimica in esame che provoca un'interferenza e incubati nel mezzo senza MTT in parallelo alla prova da correggere (% NSC_{living}).

31. Per le sostanze chimiche in esame identificate come all'origine sia di una riduzione diretta dell'MTT (cfr. il paragrafo 29) sia di un'interferenza cromatica (cfr. il paragrafo 30) occorre una terza batteria di prove, distinta dai controlli NSMTT e NSC_{living} descritti nel paragrafo precedente, quando si effettua la misurazione dell'assorbanza standard (OD). È quanto avviene solitamente con le sostanze chimiche in esame di colore scuro che interferiscono con il test dell'MTT (ad esempio blu, viola, nero) perché il loro colore intrinseco impedisce di valutarne la capacità di ridurre direttamente l'MTT come descritto al paragrafo 29. Poiché tali sostanze chimiche in esame possono legarsi sia ai tessuti vivi che ai tessuti uccisi, il controllo NSMTT potrebbe correggere non solo il potenziale di riduzione diretta

dell'MTT, ma anche l'interferenza cromatica generata dal legame tra la sostanza chimica in esame e i tessuti uccisi. Si potrebbe avere di conseguenza una doppia correzione dell'interferenza cromatica perché il controllo NSC_{living} corregge già l'interferenza cromatica causata dal legame tra la sostanza chimica in esame e i tessuti vivi. Per evitare una possibile doppia correzione dell'interferenza cromatica si deve eseguire un terzo controllo per il colore non specifico nei tessuti uccisi (NSC_{killed}). In questo controllo supplementare la sostanza chimica in esame è applicata su almeno due repliche di tessuti uccisi sottoposte all'intera prova della corrosione cutanea, ma che sono incubate in un mezzo invece che nella soluzione di MTT durante la fase di incubazione dell'MTT. Per ciascuna sostanza chimica in esame è sufficiente un unico controllo NSC_{killed} a prescindere dal numero di prove indipendenti/batterie di prove eseguite, ma dovrebbe essere condotto parallelamente al controllo NSMTT e, ove possibile, con lo stesso lotto di tessuto. La reale vitalità del tessuto è poi calcolata come la percentuale della vitalità tessutale ottenuta con i tessuti vivi esposti alla sostanza chimica in esame meno %NSMTT meno $\%NSC_{living}$ più la percentuale di colore non specifico ottenuto con tessuti uccisi esposti alla sostanza chimica in esame che provoca un'interferenza e incubati nel mezzo senza MTT, calcolata in rapporto alla prova per il controllo negativo in parallelo alla prova da correggere (% NSC_{killed}).

32. È importante notare che la riduzione non specifica dell'MTT e le interferenze del colore non specifico possono portare le rilevazioni dell'estratto di tessuto al di sopra dell'intervallo di linearità dello spettrofotometro. Di conseguenza ogni laboratorio dovrebbe determinare l'intervallo di linearità del proprio spettrofotometro con l'MTT formazan (n. CAS 57360-69-7) disponibile sul mercato prima di iniziare a testare le sostanze chimiche in esame a fini regolamentari. La misurazione dell'assorbanza standard (OD) che utilizza uno spettrofotometro è adatta a valutare i riduttori diretti dell'MTT e le sostanze chimiche in esame che provocano un'interferenza del colore quando le OD degli estratti di tessuto ottenute con le sostanze chimiche in esame senza alcuna correzione della riduzione diretta dell'MTT e/o interferenza del colore rientrano nell'intervallo di linearità dello spettrofotometro o quando la percentuale della vitalità non corretta ottenuta con la sostanza chimica in esame è già ≤ 50 %. Tuttavia, i risultati per le sostanze chimiche in esame che producono %NSMTT e/o $\%NSC_{living}$ ≥ 50 % del controllo negativo vanno presi con cautela in quanto si tratta del valore limite usato per distinguere le sostanze chimiche classificate da quelle non classificate (cfr. il paragrafo 36).

33. Per le sostanze chimiche in esame colorate non compatibili con la misurazione dell'assorbanza standard (OD) a causa dell'eccessiva interferenza con il test dell'MTT si può utilizzare la procedura alternativa della spettrofotometria HPLC/UPLC per misurare l'MTT formazan (cfr. il paragrafo 34) (36). Il sistema di spettrofotometria HPLC/UPLC consente di separare l'MTT formazan dalla sostanza chimica in esame prima della sua quantificazione (36). Per questo motivo non sono mai necessari i controlli NSC_{living} o NSC_{killed} quando si utilizza la spettrofotometria HPLC/UPLC, indipendentemente dalla sostanza chimica in esame. I controlli NSMTT sono tuttavia necessari se si sospetta che la sostanza chimica in esame sia un riduttore diretto dell'MTT o se il suo colore impedisce di valutare il potenziale di riduzione diretta dell'MTT (come descritto al paragrafo 29). Quando si utilizza la spettrofotometria HPLC/UPLC per misurare l'MTT formazan, la percentuale di vitalità tessutale è calcolata come percentuale dell'area di picco di MTT formazan ottenuta con tessuti vivi esposti alla sostanza chimica in esame in rapporto all'area di picco dell'MTT formazan ottenuta con il controllo negativo in parallelo. Per le sostanze chimiche in esame che sono riduttori diretti dell'MTT, la reale vitalità tessutale è calcolata come la percentuale della vitalità tessutale ottenuta con tessuti vivi esposti alla sostanza chimica in esame meno %NSMTT. Si noti infine che non è possibile valutare i riduttori diretti dell'MTT che possono anche provocare un'interferenza del colore e che sono trattenuti nel tessuto dopo il trattamento e la cui capacità di riduzione dell'MTT è tale da provocare delle OD (utilizzando la misurazione di OD standard) o aree di picco (utilizzando la spettrofotometria UPLC/HPLC) degli estratti di tessuto testato che non rientrano nell'intervallo di linearità dello spettrofotometro, un caso che, tuttavia, dovrebbe verificarsi solo molto raramente.

34. La spettrofotometria HPLC/UPLC può essere utilizzata per misurare l'MTT formazan anche con tutti i tipi di sostanze chimiche in esame (colorate, non colorate, riduttori e non riduttori dell'MTT) (36). Considerata la diversità tra i sistemi di spettrofotometria HPLC/UPLC, la qualificazione del sistema di spettrofotometria HPLC/UPLC va dimostrata prima del suo utilizzo per quantificare l'MTT formazan dagli estratti di tessuto soddisfacendo i criteri di accettabilità per una serie di parametri di qualificazione standard basati su quelli descritti nelle raccomandazioni per l'industria della *Food and Drug Administration* degli Stati Uniti sulla validazione del metodo bioanalitico (36) (37). Tali parametri fondamentali e i loro criteri di accettazione sono illustrati nell'appendice 4. Una volta soddisfatti i criteri di accettazione definiti nell'appendice 4, si considera che il sistema di spettrofotometria HPLC/UPLC abbia dimostrato di essere adatto e pronto a misurare l'MTT formazan nelle condizioni sperimentali descritte nel presente metodo di prova.

Criteri di accettabilità

35. Per ciascun metodo di prova che utilizza lotti di modelli di RhE validi (cfr. il paragrafo 23), i tessuti trattati con i controlli negativi presentano una OD che rispecchia la qualità dei tessuti sottoposti alle fasi di spedizione e ricezione e all'applicazione di tutti i protocolli. I valori di OD dei controlli non devono essere inferiori ai limiti storici stabiliti. Analogamente, i tessuti trattati con i controlli positivi, ossia con una soluzione acquosa di SDS al 5 %, rispecchiano la loro capacità di reagire a una sostanza chimica irritante nelle condizioni del metodo di prova (cfr. l'appendice 3 e, per maggiori informazioni, le procedure operative standard dei quattro modelli di prova incluse nel presente metodo di prova (32) (33) (34) (35)). Le opportune misurazioni associate della variabilità tra le repliche di tessuto, ossia le deviazioni standard, rientrano nei limiti di accettabilità stabiliti per il modello di prova usato (cfr. l'appendice 3).

Interpretazione dei risultati e modello predittivo

36. I valori della OD ottenuti per ciascuna sostanza chimica in esame possono essere utilizzati per calcolare la percentuale di vitalità normalizzata rispetto al controllo negativo, il cui valore è fissato al 100 %. Nel caso in cui si ricorra alla spettrofotometria HPLC/UPLC, la percentuale di vitalità tessutale è calcolata come la percentuale dell'area di picco dell'MTT formazan ottenuta con tessuti vivi esposti alla sostanza chimica in esame rispetto al picco dell'MTT formazan ottenuto con il controllo negativo parallelo. I valori limite della percentuale di vitalità cellulare che permettono di distinguere le sostanza chimica in esame irritanti da quelle non classificate e la o le procedure statistiche usate per analizzare i risultati e individuare le sostanze irritanti devono essere chiaramente definiti e documentati e deve esserne dimostrata l'idoneità (per maggiori informazioni cfr. le procedure operative standard dei modelli di prova). I valori limite per la previsione di irritazione sono riportati di seguito.

— Si ritiene necessario classificare la sostanza chimica in esame ed etichettarla conformemente al GHS dell'ONU/regolamento CLP (categoria 1 o 2) se la percentuale media della vitalità tessutale dopo l'esposizione e l'incubazione post-trattamento è inferiore o uguale (≤) al 50 %. Poiché i modelli di prova di RhE coperti dal presente metodo di prova non permettono di distinguere tra le categorie 1 e 2 del GHS dell'ONU/regolamento CLP, sono necessarie maggiori informazioni sulla corrosione cutanea per stabilire la classificazione finale (cfr. anche il documento di orientamento dell'OCSE sugli IATA (3)). Qualora venga stabilito che la sostanza chimica in esame è non corrosiva (ad esempio con i metodi di prova B.40, B.40 *bis* o B.65) e la vitalità del tessuto dopo l'esposizione e l'incubazione post-trattamento sia inferiore o uguale (≤) al 50 %, la sostanza chimica in esame è considerata irritante per la pelle, conformemente alla categoria 2 del GHS dell'ONU/regolamento CLP.

— A seconda del quadro regolamentare degli Stati membri, la sostanza di prova è considerata come non irritante per la pelle (corrispondente alla voce "senza categoria" del sistema GHS dell'ONU/regolamento CLP) se la vitalità del tessuto dopo l'esposizione e l'incubazione post-trattamento è superiore (>) al 50 %.

DATI E RELAZIONE

Dati

37. Per ciascuna batteria di prove, i dati ottenuti da singole repliche dei tessuti (ad esempio, i valori OD e le percentuali di vitalità cellulare calcolate per ogni sostanza chimica in esame, compresa la relativa classificazione) sono presentati sotto forma di tabella, compresi i dati delle prove ripetute, secondo le necessità. Sono inoltre registrati, per ogni prova, i valori medi ± la deviazione standard. Per ogni sostanza chimica in esame devono essere segnalate le interazioni osservate tra il reagente MTT e le sostanze in esame colorate.

Relazione sull'esecuzione della prova

38. La relazione sull'esecuzione della prova deve comprendere le seguenti informazioni.

Sostanze chimiche in esame e sostanze chimiche di controllo:

— sostanza monocostituente: dati di identificazione chimica, come denominazioni IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula strutturale, purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc.;

— sostanza multicostituente, UVCB o miscela: caratterizzata nella massima misura possibile con l'identità chimica (cfr. sopra), con la presenza quantitativa e con le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti;

— aspetto fisico, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche;

— origine, numero del lotto se disponibile;

— trattamento delle sostanze chimiche in esame/sostanze di controllo prima della prova, se applicabile (ad esempio, riscaldamento, frantumazione);

— stabilità della sostanza chimica in esame, data limite di utilizzo, data della nuova analisi, se nota;

— condizioni di conservazione.

Modello di RhE e protocollo utilizzati; motivo della scelta (se del caso)

Condizioni sperimentali:

— modello di RhE utilizzato (incluso il numero di lotto);

— informazioni su taratura degli apparecchi di misurazione (ad esempio spettrofotometro), lunghezza d'onda e banda passante (se del caso), utilizzate per quantificare l'MTT formazan e l'intervallo di linearità dell'apparecchio di misurazione; descrizione del metodo utilizzato per quantificare l'MTT formazan;

— descrizione delle specifiche del sistema di spettrofotometria HPLC/UPLC, se del caso; informazioni complete di supporto sul modello di RhE specifico utilizzato e sulla sua efficienza, che includono (elenco non esauriente):

  i) vitalità;

  ii) funzione di barriera;

  iii) morfologia;

  iv) riproducibilità e capacità predittiva;

  v) controlli di qualità (QC) del modello;

— riferimenti a dati storici del modello, che includono, tra l'altro, l'accettabilità dei dati di QC rispetto ai dati storici del lotto;

— dimostrazione della competenza nell'esecuzione del metodo di prova prima del suo uso sistematico testando le sostanze di prova a fini di competenza.

Procedura di prova:

— descrizione dettagliata della procedura sperimentale utilizzata (incluse le procedure di lavaggio utilizzate dopo il periodo di esposizione); dosi della sostanza chimica in esame e delle sostanze chimiche di controllo utilizzate;

— durata e temperatura dell'esposizione e del periodo di incubazione post-esposizione;

— indicazione dei controlli usati per riduttori dell'MTT diretti e/o sostanze chimiche di prova coloranti, se del caso;

— numero delle repliche di tessuti utilizzate per sostanza chimica in esame e sostanza di controllo (controllo positivo, controllo negativo e NSMTT, NSC_{living} e NSC_{killed}, se del caso);

— descrizione dei criteri decisionali/modello predittivo applicati in funzione del modello di RhE utilizzato;

— descrizione di tutte le modifiche apportate alla procedura sperimentale (incluso alle procedure di lavaggio).

Criteri di accettabilità della prova e della batteria di prove:

— valori medi del controllo positivo e negativo e intervalli di accettazione in funzione dei dati storici; variabilità accettabile tra le repliche di tessuti per i controlli positivi e negativi;

— variabilità accettabile tra le repliche di tessuti per sostanza chimica in esame.

Risultati:

— presentazione sotto forma di tabella dei dati delle singole sostanze chimiche in esame, ogni batteria di prove e ogni misurazione delle repliche incluse la OD o l'area di picco dell'MTT formazan, la percentuale di vitalità tessutale, la percentuale media di vitalità tessutale e le deviazioni standard;

— se del caso, i risultati dei controlli utilizzati per i riduttori diretti dell'MTT e/o per le sostanze chimiche in esame coloranti, inclusi la OD o l'area di picco dell'MTT formazan, %NSMTT, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, le deviazioni standard e la percentuale finale corretta di vitalità tessutale;

— i risultati ottenuti con la o le sostanze chimiche in esame in rapporto ai criteri di accettabilità della prova e della batteria di prove definiti;

— descrizione di altri effetti osservati;

— risultante classificazione con riferimento al modello predittivo/ai criteri decisionali utilizzati.

Discussione dei risultati

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Disponibile qui: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) EURL-ECVAM (2009). Statement on the «Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards», Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9 April 2009. Disponibile qui: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf

(3) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) Capitolo B.4 del presente allegato, Irritazione/corrosione cutanea acuta.

(5) Capitolo B.40 del presente allegato, Corrosione cutanea *in vitro*: metodo di prova della resistenza elettrica transcutanea (TER).

(6) Capitolo B.40 *bis* del presente allegato, Corrosione cutanea *in vitro*: metodo di prova su un modello di epidermide umana ricostituita (RhE)

(7) Capitolo B.65 del presente allegato, Metodo di prova *in vitro* con membrana impermeabile per la corrosione cutanea.

(8) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 34) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351-367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329-349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.

(16) Spielmann, H., 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., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.

(17) Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α.

(18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603-619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351-358.

(20) EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Disponibile qui: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf

(21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *N.B. These are the original PS used for the validation of two test methods. These PS should not be used any longer as an updated version (8) is now available.*

(22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf

(23) OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol* Sci, 34, 327-334

(25) Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111-122

(26) OECD (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 159), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(27) OECD (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 155), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.

(29) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231-243.

(30) Eskes, C. *et al*. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol.Pharmacol*. 62, 393-403).

(31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(32) EpiSkin™ (February 2009). SOP, Version 1.8ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals

(33) EpiDerm™ (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).

(34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.

(35) LabCyte (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model «LabCyte EPI-MODEL24»

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Manuscript in preparation.

(37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Disponibile qui: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

(38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, in: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *N.B. This is the current version of the ECVAM PS, updated in 2009 in view of the implementation of UN GHS. These PS should not be used any longer as an updated version (8) is now available related to the present TG.*

(40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.

(41) EC (2001). Direttiva 2001/59/CE della Commissione, del 6 agosto 2001, recante ventottesimo adeguamento al progresso tecnico della direttiva 67/548/CEE del Consiglio concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose (GU L 225 del 21.8.2001, pag. 1).

Appendice 1

DEFINIZIONI

Accuratezza: grado di concordanza tra i risultati ottenuti con il metodo di prova e i valori di riferimento accettati. Misura l'efficienza del metodo di prova e costituisce un aspetto della pertinenza. Il termine è spesso utilizzato come sinonimo di «concordanza» per indicare la percentuale di risultati corretti di un metodo di prova (9).

Vitalità cellulare: parametro che misura l'attività totale in una popolazione di cellule, ad esempio la capacità delle deidrogenasi mitocondriali cellulari di ridurre il colorante vitale MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ile)-2,5-difeniltetrazolio bromuro, tiazolil blu) che, in funzione dell'endpoint misurato e del tipo di disegno sperimentale utilizzato, corrisponde al numero totale e/o alla vitalità delle cellule viventi.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Concordanza: misura dell'efficacia dei modelli di prova che forniscono un risultato ordinabile in categorie e rappresenta un aspetto della pertinenza. Il termine è usato come sinonimo di «accuratezza» ed è definito come la proporzione di tutte le sostanze chimiche in esame che sono correttamente classificate come positive o negative. La concordanza dipende strettamente dalla prevalenza di risultati positivi in tutti i tipi di sostanze chimiche esaminate (9).

ET_{50}: valore che può essere calcolato determinando il tempo di esposizione necessario per ridurre la vitalità cellulare del 50 % in seguito all'applicazione della sostanza chimica di riferimento ad una concentrazione specifica e fissa; cfr. anche IC_{50}.

Sistema globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (UN GHS): sistema di classificazione delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) secondo tipi e livelli standardizzati di rischio fisico, sanitario e ambientale, che elabora i relativi elementi di comunicazione, quali pittogrammi, avvertenze, indicazioni di pericolo, consigli di prudenza e schede informative di sicurezza, per trasmettere informazioni sugli effetti avversi di dette sostanze a tutela delle persone (compresi datori di lavoro, lavoratori, trasportatori, consumatori e personale di pronto intervento) e dell'ambiente (1).

HPLC: cromatografia liquida ad alta prestazione.

IATA: approcci integrati in materia di prove e valutazioni (*Integrated Approaches to Testing and Assessment*).

IC_{50}: valore che può essere calcolato per determinazione della concentrazione alla quale una sostanza chimica di riferimento riduce la vitalità dei tessuti del 50 % (IC_{50}) dopo un tempo di esposizione fisso, cfr. anche ET_{50}.

Dose infinita: quantità di sostanza chimica in esame applicata all'epidermide che supera la quantità necessaria per coprire in maniera completa e uniforme la superficie dell'epidermide.

Miscela: una miscela o una soluzione composta di due o più sostanze.

Sostanza monocostituente: sostanza, definita attraverso la sua composizione quantitativa, in cui un costituente principale è presente in percentuale pari ad almeno l'80 % (p/p).

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ile)-2,5-difeniltetrazolio bromuro; tiazolil blu tetrazolio bromuro

Sostanza multicostituente: sostanza, definita attraverso la sua composizione quantitativa, in cui più costituenti principali sono presenti in concentrazione ≥ 10 % (p/p) e < 80 % (p/p). Una sostanza multicostituente è il risultato di un processo di fabbricazione. La differenza tra miscela e sostanza multicostituente è che una miscela è ottenuta attraverso la miscelazione di due o più sostanze senza che avvenga una reazione chimica. Una sostanza multicostituente è il risultato di una reazione chimica.

NSC_{killed}: colore non specifico in tessuti uccisi.

NSC_{living}: colore non specifico in tessuti vivi.

NSMTT: riduzione non specifica dell'MTT.

Standard di prestazione: standard, basati su un metodo di riferimento validato, che consentono di valutare la comparabilità di un metodo proposto che è simile sotto il profilo strutturale e funzionale. Detti standard comprendono: i) gli elementi essenziali del metodo di prova; ii) un elenco minimo di sostanze chimiche di riferimento scelte tra le sostanze utilizzate per dimostrare le prestazioni accettabili del metodo di prova validato; e iii) in funzione dei risultati ottenuti con il metodo di riferimento validato, i livelli comparabili di accuratezza e affidabilità che il metodo proposto dovrebbe ottenere quando viene valutato utilizzando l'elenco minimo di sostanze di riferimento (9).

PC: controllo positivo, una replica che contiene tutti i componenti di un sistema di prova e che è trattato con una sostanza chimica che notoriamente induce una reazione positiva. Perché sia possibile valutare la variabilità nel tempo della risposta del controllo positivo, l'intensità di tale risposta non dovrebbe essere eccessiva.

Pertinenza: descrizione del rapporto tra la prova e l'effetto studiato; indica se la prova è significativa e utile per uno scopo specifico. È il grado con cui la prova misura o prevede correttamente l'effetto biologico di interesse. La pertinenza comprende una valutazione dell'accuratezza (concordanza) di una prova (9).

Affidabilità: misura in cui l'esecuzione di un metodo di prova può essere riprodotta nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi seguendo il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità intra-laboratorio e inter-laboratori (9).

Prova sostitutiva: prova progettata per sostituire una prova usata correntemente e accettata per l'individuazione dei pericoli e/o la valutazione dei rischi, e che è stata determinata per fornire una protezione equivalente o maggiore della salute umana, animale o dell'ambiente, se del caso, rispetto alla prova accettata, per tutte le possibili situazioni sperimentali e le sostanze chimiche (9).

Batteria di prove: una batteria di prove consiste nel testare una o più sostanze chimiche in esame simultaneamente a un controllo negativo e a un controllo positivo.

Sensibilità: proporzione di tutte le sostanze positive/attive correttamente classificate dalla prova. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di un metodo (9).

Irritazione cutanea *in vivo*: comparsa di danni reversibili sulla pelle a seguito dell'applicazione della sostanza in esame per un massimo di 4 ore. L'irritazione cutanea è una reazione locale del tessuto cutaneo interessato che si manifesta poco dopo la stimolazione (38). È provocata da una reazione infiammatoria locale che coinvolge il sistema immunitario innato (non specifico) del tessuto. Si caratterizza essenzialmente per la reversibilità del processo, che comprende reazioni infiammatorie e la maggior parte dei segni clinici caratteristici dell'irritazione (eritema, edema, prurito e dolore) associati al processo infiammatorio.

Specificità: proporzione di tutte le sostanze negative/inattive correttamente classificate dal test. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di un metodo (9).

Sostanza: un elemento chimico e i suoi composti, allo stato naturale od ottenuti per mezzo di un procedimento di fabbricazione, compresi gli additivi necessari a mantenerne la stabilità e le impurezze derivanti dal procedimento utilizzato, ma esclusi i solventi che possono essere separati senza compromettere la stabilità della sostanza o modificarne la composizione.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata applicando il presente metodo di prova.

UPLC: cromatografia liquida ad altissima prestazione.

UVCB: sostanze la cui composizione non è conosciuta o è variabile, prodotti di una reazione complessa o i materiali origine biologica.

Appendice 2

MODELLI DI PROVA INCLUSI NEL PRESENTE METODO DI PROVA

n.	Nome del modello di prova	Tipo di studio di validazione	Riferimenti
1	EpiSkin™	Studio prospettico di validazione completo (2003-2007) I componenti di questo modello sono stati utilizzati per definire i componenti principali dei metodi di prova degli standard di prestazione dell'ECVAM originali e aggiornati (39) (40) (21) (*). Inoltre, i dati del modello relativi alla distinzione tra sostanza non classificate e sostanza classificate ha costituito la base principale per definire i valori della specificità e della sensibilità degli standard di prestazione originali (*).	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*originale*): all'inizio questo modello di prova è stato sottoposto a uno studio prospettico di validazione completo insieme al n. 1 tra il 2003 e il 2007. I componenti di questo modello sono stati utilizzati per definire i componenti principali dei metodi di prova degli standard di prestazione dell'ECVAM originali e aggiornate (39) (40) (21) (*). **EpiDerm™ SIT (EPI-200):** una modifica del modello EpiDerm™ originale è stata validata usando gli standard di prestazione originali dell'ECVAM (21) nel 2008 (*)	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Studio di validazione basato sugli standard di prestazione originali dell'ECVAM (21) nel 2008 (*).	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Studio di validazione (2011-2012) basato sugli standard di prestazione della linea guida dell'OCSE n. 439 (8), a loro volta basati sugli standard di prestazione aggiornati dell'ECVAM (*) (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) e standard di prestazione della linea guida dell'OCSE (8) (*)

(*) Gli standard di prestazione dell'ECVAM (21) sono stati sviluppati nel 2007 dopo il completamento dello studio prospettico di validazione (16) che aveva valutato i risultati dei modelli di prova n. 1 e 2 in riferimento al sistema di classificazione ai sensi del 28° adeguamento della direttiva UE sulle sostanze pericolose (41). Nel 2008 sono stati introdotti il GHS dell'ONU (1) e il regolamento CLP che hanno efficacemente spostato il valore limite per distinguere le sostanze non classificate da quelle classificate da un punteggio *in vivo* di 2,0 a 2,3. Nel 2009 i valori dell'accuratezza e l'elenco delle sostanze chimiche di riferimento degli standard di prestazione dell'ECVAM sono stati aggiornati per tenere conto della prescrizione così modificata (2) (39) (40). Come gli standard di prestazione originali, anche quelli aggiornati si basavano in larga misura sui dati relativi ai modelli n. 1 e 2 (16), ma si avvalevano inoltre dei dati sulle sostanze chimiche di riferimento del modello n. 3. Nel 2010 sono stati usati gli standard di prestazione aggiornati dell'ECVAM per elaborare gli standard di prestazione relativi a questa linea guida (8). Ai fini del presente metodo di prova, EpiSkin™ è considerato il VRM perché è stato usato per sviluppare tutti i criteri degli standard di prestazione. Per maggiori informazioni sugli studi di validazione, una raccolta dei dati generati e la contestualizzazione degli adattamenti necessari degli standard di prestazione a seguito dell'attuazione del GHS dell'ONU/regolamento CLP, si rimanda al documento esplicativo generale dell'ECVAM/BfR della corrispondente linea guida dell'OCSE n. 439 (23).

SIT: prova dell'irritazione cutanea (*Skin Irritation Test*)

RHE: epidermide umana ricostituita (*Reconstructed Human Epidermis*)

Appendice 3

PARAMETRI DEI PROTOCOLLI SPECIFICI PER CIASCUN MODELLO DI PROVA INCLUSI NEL PRESENTE METODO DI PROVA

I modelli di RhE mostrano protocolli molto simili e, in particolare, usano tutti un periodo di post-incubazione di 42 ore (32) (33) (34) (35). Le variazioni riguardano principalmente tre parametri connessi alle diverse funzioni di barriera dei modelli di prova e sono: A) tempo e volume pre-incubazione; B) applicazione delle sostanze chimiche in esame e C) volume post-incubazione.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Pre-incubazione				
Tempo di incubazione	18-24 ore	18-24 ore	< 2 ore	15-30 ore
Volume del mezzo	2 ml	0,9 ml	0,3 o 1 ml	0,5 ml
B) Applicazione della sostanza chimica in esame				
Per i liquidi	10µl (26µl/cm^2)	30µl (47µl/cm^2)	16µl (32µl/cm^2)	25µl (83µl/cm^2)
Per i solidi	10mg (26mg/cm^2) + AD (5µl)	25mg (39mg/cm^2) + DPBS (25µl)	16mg (32mg/cm^2) + AD (10µl)	25mg (83mg/cm^2) + AD (25µl)
Uso della rete di nylon	non utilizzata	se necessario	usata	non utilizzata
Tempo totale di applicazione	15 minuti	60 minuti	42 minuti	15 minuti
Temperatura di applicazione	TA	a) a TA per 25 minuti b) a 37 °C per 35 minuti	TA	TA
C) Volume post-incubazione				
Volume del mezzo	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
D) Variabilità di accettazione massima				
Deviazione standard tra repliche di tessuto	SD≤18	SD≤18	SD≤18	SD≤18

TA: temperatura ambiente
AD: acqua distillata
DPBS: tampone fosfato salino di Dulbecco

Appendice 4

CRITERI DI ACCETTABILITÀ E PARAMETRI FONDAMENTALI PER LA QUALIFICAZIONE DI UN SISTEMA DI SPETTROFOTOMETRIA HPLC/UPLC PER MISURARE L'MTT FORMAZAN ESTRATTO DA UN TESSUTO DI RHE

Parametro	Protocollo derivato dalle raccomandazioni della *Food and Drug Administration* (36) (37)	Criteri di accettabilità
Selettività	Analisi di isopropanolo, bianco vivo (isopropanolo estratto da tessuti di RhE vivi non trattati), bianco morto (isopropanolo estratto da tessuti di RhE uccisi non trattati)	$Area_{interferenza}$ ≤ 20 % di $Area_{LLOQ}$ [1]
Precisione	Controlli di qualità (ossia MTT formazan a 1,6 µg/ml, 16 µg/ml e 160 µg/ml) in isopropanolo (n=5)	CV ≤ 15 % o ≤ 20 % per il LLOQ
Accuratezza	Controlli di qualità in isopropanolo (n=5)	% Dev ≤ 15 % o ≤ 20 % per LLOQ
Effetto matrice	Controlli di qualità in bianco vivo (n=5)	85 % ≤ effetto matrice % ≤ 115 %
Effetto residuale	Analisi dell'isopropanolo dopo un ULOQ [2] standard	$Area_{interferenza}$ ≤ 20 % di $Area_{LLOQ}$
Riproducibilità (nella giornata)	3 curve di taratura indipendenti (sulla base di 6 diluizioni consecutive a 1/3 di MTT formazan in isopropanolo, cominciando a ULOQ, ossia a 200 µg/ml); Controlli di qualità in isopropanolo (n=5)	Curve di taratura: % Dev ≤ 15 % o ≤ 20 % per LLOQ Controlli di qualità: %Dev ≤ 15 % e CV ≤ 15 %
Riproducibilità (tra un giorno e l'altro)	Giorno 1: 1 curva di taratura e controlli di qualità in isopropanolo (n=3) Giorno 2: 1 curva di taratura e controlli di qualità in isopropanolo (n=3) Giorno 3: 1 curva di taratura e controlli di qualità in isopropanolo (n=3)	
Stabilità a breve termine dell'MTT formazan in un estratto di tessuto RhE	Controlli di qualità in bianco vivo (n=3) analizzati il giorno della preparazione e dopo 24 ore di conservazione a temperatura ambiente	%Dev ≤ 15 %
Stabilità a lungo termine dell'MTT formazan in un estratto di tessuto RhE, se necessario	Controlli di qualità in bianco vivo (n=3) analizzati il giorno della preparazione e dopo diversi giorni di conservazione alle temperature specificate (ossia 4 °C, -20 °C, -80 °C)	%Dev ≤ 15 %"

[1] LLOQ: limite inferiore di quantificazione (*Lower Limit of Quantification*), definito per coprire l'1-2 % di vitalità tessutale, ossia 0,8 µg/ml.
[2] ULOQ: limite superiore di quantificazione (*Upper Limit of Quantification*), definito per essere almeno due volte superiore alla concentrazione massima di MTT formazan prevista negli estratti di isopropanolo dei controlli negativi, ossia 200 µg/ml.

8) Nella parte B sono aggiunti i seguenti capitoli:

"B.63 **PROVA DI SCREENING DELLA TOSSICITÀ PER LA RIPRODUZIONE/LO SVILUPPO**

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida n. 421 dell'OCSE (2016). Le linee guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche sono periodicamente rivedute e aggiornate alla luce del progresso scientifico. La linea guida n. 421 sulla prova di screening è stata adottata inizialmente nel 1995, sulla base di un protocollo per una «prova preliminare di screening della tossicità per la riproduzione» di cui si è discusso nell'ambito di due riunioni di esperti, a Londra nel 1990 (1) e a Tokyo nel 1992 (2).

2. Il presente metodo di prova è stato aggiornato mediante l'aggiunta di endpoint pertinenti per il rilevamento di interferenti endocrini, come seguito all'attività ad alta priorità avviata dall'OCSE nel 1998 volta a rivedere le linee guida esistenti e a elaborarne di nuove, per lo screening e la sperimentazione relativi a potenziali interferenti endocrini (3). La linea guida n. 407 dell'OCSE (studio della tossicità orale con somministrazione ripetuta di dosi per 28 giorni sui roditori, corrispondente al capitolo B.7 del presente allegato), ad esempio, è stata migliorata nel 2008 mediante l'aggiunta di parametri adatti per l'individuazione dell'attività endocrina delle sostanze in esame. La linea guida n. 421 è stata aggiornata con l'intento di includere gli endpoint pertinenti per il rilevamento di interferenti endocrini nelle linee guida in cui i periodi di esposizione coprono alcuni dei periodi sensibili dello sviluppo (i periodi precedenti o immediatamente successivi alla nascita).

3. Gli ulteriori endpoint pertinenti per il rilevamento di interferenti endocrini selezionati, che fanno parte anche della linea guida n. 443 (studio esteso di tossicità per la riproduzione su una generazione, corrispondente al capitolo B.56 del presente allegato), sono stati aggiunti alla linea guida n. 421 sulla base di uno studio di fattibilità riguardante questioni scientifiche e tecniche relative alla loro inclusione, come pure gli eventuali adattamenti del disegno sperimentale necessari per la loro inclusione (4).

4. Il presente metodo di prova è inteso a generare informazioni limitate concernenti gli effetti delle sostanze chimiche in esame sulla capacità riproduttiva maschile e femminile, quali la funzione delle gonadi, il comportamento in fase di accoppiamento, il concepimento, lo sviluppo dell'organismo concepito e il parto. Esso non rappresenta un'alternativa ai metodi di prova esistenti B.31, B.34, B.35 e B.56, né li sostituisce.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

5. Il presente metodo di prova di screening può essere utilizzato per fornire informazioni iniziali concernenti i possibili effetti sulla riproduzione e/o lo sviluppo, nella fase iniziale di valutazione delle proprietà tossicologiche delle sostanze chimiche o nella valutazione di sostanze potenzialmente pericolose. Esso può essere utilizzato anche nell'ambito di una serie di prove di screening iniziali per le sostanze chimiche esistenti per le quali le informazioni tossicologiche disponibili sono scarse o inesistenti, come studio volto a determinare gli intervalli di dosaggio per studi più approfonditi sulla riproduzione o sullo sviluppo o in altri casi in cui sia ritenuto opportuno. Durante lo svolgimento dello studio è opportuno seguire i principi guida e le considerazioni di cui al documento di orientamento dell'OCSE n. 19, *Recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation* (5).

6. Il presente metodo di prova non fornisce informazioni complete su tutti gli aspetti della riproduzione e dello sviluppo. In particolare, esso offre solo mezzi limitati per individuare manifestazioni postnatali di un'esposizione prenatale o effetti eventualmente riconducibili a un'esposizione postnatale. Tenuto conto, tra le altre cose, del numero relativamente ridotto di animali nei gruppi di trattamento, della selettività degli endpoint e della breve durata dello studio, il presente metodo non fornisce prove sufficienti per trarre conclusioni definitive circa l'assenza di effetti. Inoltre, in assenza di dati desunti da altre prove di tossicità per la riproduzione/lo sviluppo, risultati positivi sono utili per una valutazione iniziale dei pericoli e permettono di prendere decisioni circa la necessità di procedere a ulteriori prove e i tempi per effettuarle.

7. I risultati ottenuti per quanto riguarda i parametri endocrini devono essere interpretati alla luce del «Quadro concettuale dell'OCSE per le prove e la valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino» (6). La linea guida migliorata dell'OCSE n. 421 fa parte del livello 4 di questo quadro concettuale come saggio *in vivo* in grado di fornire dati sugli effetti nocivi sugli endpoint pertinenti per il sistema endocrino. Un segnale endocrino potrebbe tuttavia non essere considerato di per sé una prova sufficiente ad attestare che la sostanza chimica in esame è un interferente endocrino.

8. Il presente metodo di prova prevede la somministrazione orale della sostanza chimica da esaminare. Potrebbero essere necessarie modifiche in caso di utilizzo di altre vie di somministrazione.

9. Prima di applicare il presente metodo di prova a una miscela per generare dati ai fini regolamentari previsti, si deve considerare se, e in caso affermativo, perché, esso possa fornire risultati adeguati a tale scopo. Tali considerazioni non sono necessarie laddove esista una disposizione normativa che obblighi a sottoporre a prova la miscela.

10. L'appendice 1 contiene le definizioni dei termini utilizzati.

PRINCIPIO DELLA PROVA

11. La sostanza chimica in esame viene somministrata in dosi graduate a diversi gruppi di maschi e femmine. Ai maschi le dosi devono essere somministrate per almeno quattro settimane e fino al prima della soppressione programmata, compreso tale giorno (tale periodo comprende un minimo di due settimane prima dell'accoppiamento, il tempo dell'accoppiamento e circa due settimane dopo l'accoppiamento). Tenuto conto della durata limitata del periodo di esposizione prima dell'accoppiamento nei maschi, la fertilità potrebbe non essere un particolare indicatore di sensibilità della tossicità testicolare. È pertanto essenziale un esame istologico particolareggiato delle prove. La combinazione di un periodo di esposizione di due settimane prima dell'accoppiamento (seguito da osservazioni sull'accoppiamento e la fertilità) e di un periodo di esposizione complessivo di almeno quattro settimane (seguito da un dettagliato esame istopatologico delle gonadi maschili) è considerata sufficiente a consentire l'individuazione della maggior parte degli effetti sulla fertilità maschile e sulla spermatogenesi.

12. Alle femmine la sostanza va somministrata durante l'intero studio. Tale periodo comprende due settimane prima dell'accoppiamento (con l'obiettivo di coprire almeno due cicli estrali completi), l'intervallo variabile che precede il concepimento, la durata della gestazione e almeno tredici giorni dopo il parto, fino al giorno precedente alla soppressione programmata, compreso tale giorno.

13. La durata dello studio, dopo l'acclimatazione e la valutazione del ciclo estrale precedente la somministrazione, dipende dal comportamento della femmina ed è di circa 63 giorni [almeno 14 giorni prima dell'accoppiamento, un massimo di 14 giorni per l'accoppiamento, 22 giorni di gestazione, 13 giorni di allattamento].

14. Durante il periodo di somministrazione gli animali vengono esaminati attentamente e quotidianamente al fine di rilevare eventuali segni di tossicità. Gli animali deceduti o soppressi durante il periodo della prova vengono sottoposti a necroscopia; al termine della prova gli animali superstiti vengono soppressi e sottoposti a necroscopia.

DESCRIZIONE DEL METODO

Selezione della specie animale

15. Il presente metodo di prova è destinato ad essere utilizzato con i ratti. Se i parametri specificati nel metodo di prova sono studiati in un'altra specie di roditori, occorre fornire una giustificazione dettagliata. Nel programma internazionale di validazione per l'individuazione degli interferenti endocrini nella linea guida n. 407 dell'OCSE (che corrisponde al capitolo B.7 del presente allegato) il ratto è stata l'unica specie animale utilizzata. Non vanno usati ceppi a bassa fecondità o con nota elevata incidenza di difetti dello sviluppo. Si devono utilizzare animali vergini sani, non sottoposti in precedenza a esperimenti. Gli animali utilizzati nella prova devono essere caratterizzati quanto alle specie, al ceppo, al sesso, al peso e all'età. All'inizio dello studio la variazione ponderale degli animali utilizzati deve essere minima e non superare il 20 % del peso medio di ciascun sesso. Per gli studi preliminari a studi a lungo termine o effettuati su un'intera generazione, è preferibile ricorrere in entrambi gli studi ad animali dello stesso ceppo e della stessa provenienza.

Condizioni di stabulazione e alimentazione

16. Tutte le procedure devono attenersi agli standard locali in materia di cura degli animali da esperimento. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °). L'umidità relativa deve raggiungere almeno il 30 % e preferibilmente non superare il 70 % (eccetto nel corso delle pulizie degli ambienti), ma occorre puntare a un valore del 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con un fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 ore di oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata di acqua da bere. La scelta della dieta può essere influenzata dalla necessità di garantire un'adeguata miscela della sostanza chimica in esame, se quest'ultima è somministrata con il cibo.

17. Gli animali devono essere sistemati nelle gabbie in piccoli gruppi dello stesso sesso; possono essere sistemati in gabbie individuali se necessario per ragioni scientifiche. Ciascuna gabbia non deve ospitare più di cinque animali. L'accoppiamento va effettuato in gabbie adeguate allo scopo. Le femmine gravide devono essere tenute in gabbie individuali e rifornite di materiale per la costruzione della tana. Le femmine che allattano vanno poste in gabbie individuali insieme alla prole.

18. L'alimentazione deve essere analizzata periodicamente per verificare la presenza di contaminanti. Un campione del mangime somministrato deve essere conservato fino al completamento della relazione.

Preparazione degli animali

19. Gli animali adulti, sani e giovani vengono suddivisi a caso in gruppi di controllo e gruppi di trattamento. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. Gli animali vanno identificati inequivocabilmente e acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno cinque giorni prima dell'inizio dello studio.

Preparazione delle dosi

20. Si raccomanda di somministrare la sostanza chimica in esame per via orale, a meno che non si considerino più appropriate altre vie di somministrazione. Se si sceglie la via orale, la sostanza chimica è generalmente somministrata mediante sonda gastrica; tuttavia, in alternativa, può essere somministrata con la dieta o l'acqua da bere.

21. Ove necessario, la sostanza in esame è disciolta o sospesa in un mezzo disperdente adeguato. Si raccomanda di prendere anzitutto in considerazione, ove possibile, l'uso di una soluzione/sospensione acquosa, e in seconda battuta quello di una soluzione/emulsione in olio (ad esempio olio di semi di mais) e infine la possibile soluzione in altri mezzi disperdenti. Le caratteristiche tossiche dei mezzi disperdenti diversi dall'acqua devono essere note. È necessario determinare la stabilità e l'omogeneità della sostanza chimica in esame nel mezzo disperdente.

PROCEDURA

Numero e sesso degli animali

22. Si raccomanda di costituire gruppi di almeno 10 maschi e 12-13 femmine. Nella fase pre-esposizione si procede alla valutazione della ciclicità estrale nelle femmine e gli animali che non presentano un ciclo tipico di 4-5 giorni non sono inclusi nello studio; si raccomanda pertanto di utilizzare un numero supplementare di femmine per ottenere 10 femmine per ciascun gruppo. Eccetto i casi in cui gli effetti tossici sono notevoli, si dovrebbero ottenere per ciascun gruppo almeno 8 femmine gravide, che generalmente è il numero minimo accettabile. Lo scopo è ottenere un numero di gravidanze e nidiate che consenta una valutazione significativa del potenziale della sostanza chimica in esame di influire negativamente sulla fertilità, sulla gravidanza, sul comportamento materno, sulla suzione, sulla crescita e sullo sviluppo della progenie F_1, dal concepimento al tredicesimo giorno dopo il parto.

Dosaggio

23. Si utilizzano generalmente almeno tre gruppi da trattare e un gruppo di controllo. I livelli di dosaggio possono essere basati sulle informazioni derivanti dalle prove di tossicità acuta o sui risultati di studi con dosi ripetute. Fatta eccezione per la somministrazione della sostanza chimica in esame, gli animali del gruppo di controllo devono essere trattati in modo identico agli esemplari dei gruppi sottoposti al trattamento. Se si usa un mezzo disperdente per la somministrazione della sostanza chimica in esame, al gruppo di controllo verrà somministrato il medesimo mezzo disperdente nel volume massimo utilizzato.

24. I livelli di dosaggio devono essere selezionati tenendo conto di tutti i dati disponibili sulla tossicità e le caratteristiche (tossico-)cinetiche. Bisogna inoltre tener conto del fatto che potrebbero esserci differenze di sensibilità tra le femmine gravide e quelle non gravide. Il livello massimo di dosaggio deve essere tale da indurre effetti tossici senza cagionare la morte o sofferenze gravi. Deve essere inoltre definita una serie decrescente di livelli di dosaggio al fine di individuare un'eventuale correlazione dose-risposta e l'assenza di effetti avversi al dosaggio minimo (NOAEL, *no-observed-adverse effects*). In genere, per determinare i livelli decrescenti di dosaggio si consiglia un intervallo con un fattore compreso tra 2 e 4 e spesso è preferibile aggiungere un quarto gruppo di studio piuttosto che avere un intervallo eccessivamente lungo (ad esempio superiore a un fattore 10) fra un dosaggio e l'altro.

25. Nel caso di tossicità generale osservata (ad es. riduzione del peso corporeo, effetti a livello epatico, cardiaco, polmonare o renale ecc.) o di altri cambiamenti che potrebbero non essere dovuti ad effetti tossici (ad es. diminuzione dell'assunzione di alimenti, dilatazione del fegato), gli effetti rilevati sugli endpoint endocrini devono essere interpretati con cautela.

Prova limite

26. Se uno studio orale, effettuato secondo le procedure descritte per il presente studio, con un livello di dosaggio di almeno 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno o in caso di somministrazione con gli alimenti o l'acqua, a una concentrazione equivalente, non produce effetti tossici osservabili e se i dati relativi a sostanze di struttura analoga non indicano tossicità, si può considerare che non è necessario eseguire uno studio completo utilizzando diversi livelli di dosaggio. Si applica la prova limite, tranne quando l'esposizione umana indica la necessità di utilizzare un livello di dosaggio orale più elevato. Per altri tipi di somministrazione, ad esempio inalazione o applicazione cutanea, la concentrazione massima raggiungibile dipende in molti casi dalle proprietà fisico-chimiche delle sostanze chimiche da esaminare.

Somministrazione delle dosi

27. Agli animali viene somministrata una dose giornaliera della sostanza chimica in esame sette giorni alla settimana. Se viene effettuata per via intragastrica, la somministrazione deve avvenire in dose singola mediante sonda gastrica o idonea cannula per intubazione. Il volume massimo di liquido che può essere somministrato in una sola volta dipende dalla taglia dell'animale. Il volume non deve superare 1 ml/100 g di peso corporeo, tranne nel caso delle soluzioni acquose che possono essere somministrate in quantità pari a 2 ml/100 g di peso corporeo. Salvo nel caso di sostanze chimiche irritanti o corrosive, i cui effetti di norma tendono a esacerbarsi con l'aumentare della concentrazione, la variabilità del volume somministrato deve essere ridotta al minimo adeguando la concentrazione, in modo da mantenere un volume costante per tutti i livelli di dosaggio.

28. Per le sostanze chimiche somministrate con la dieta o l'acqua da bere è importante impedire che la quantità della sostanza chimica in esame interferisca con la normale alimentazione o il normale bilancio dei liquidi. Se la sostanza chimica in esame è somministrata con la dieta, si può utilizzare una concentrazione costante nella dieta (ppm) o un livello di dosaggio costante in funzione del peso corporeo di ciascun animale; la scelta di eventuali alternative va specificata. Nel caso di sostanze chimiche somministrate mediante sonda gastrica, la dose va somministrata ogni giorno all'incirca agli stessi orari e regolata almeno settimanalmente per mantenere un livello costante delle dosi rispetto al peso corporeo degli animali.

Protocollo sperimentale

29. La somministrazione della sostanza a entrambi i sessi deve iniziare almeno due settimane prima dell'accoppiamento, dopo un periodo di acclimatazione di almeno cinque giorni e dopo avere osservato nelle femmine un ciclo estrale normale (durante un periodo di pre-trattamento di 2 settimane). Lo studio deve essere programmato in modo tale che la valutazione del ciclo estrale inizi subito dopo il raggiungimento della maturità sessuale completa da parte degli animali. Ciò può variare leggermente a seconda dei ceppi di ratti e dei laboratori, ad esempio 10 settimane per i ratti Sprague Dawley e circa 12 settimane per i ratti Wistar. Le femmine con prole devono essere soppresse il tredicesimo giorno dopo il parto o poco dopo. Il giorno della nascita (ossia quello in cui viene completato il parto) è il giorno 0 post-parto. Le femmine per le quali non vi sono prove di avvenuta copulazione sono soppresse 24-26 giorni dopo l'ultimo giorno del periodo di accoppiamento. La somministrazione della sostanza va continuata, in entrambi i sessi, durante il periodo di accoppiamento. Dopo tale periodo, la somministrazione deve proseguire per i maschi almeno fino al completamento del periodo di dosaggio totale minimo di 28 giorni. I maschi sono in seguito soppressi o, in alternativa, mantenuti in vita e continuano a ricevere la sostanza in esame ai fini di un eventuale secondo accoppiamento, ove ritenuto opportuno.

30. La somministrazione giornaliera delle dosi alle femmine riproduttrici va continuata per tutta la gravidanza e almeno fino al tredicesimo giorno dopo il parto o al giorno prima della soppressione incluso. Per gli studi in cui la sostanza chimica in esame è somministrata tramite inalazione o per via cutanea, la somministrazione deve proseguire almeno fino al diciannovesimo giorno di gestazione incluso e deve essere iniziata di nuovo appena possibile e comunque entro il quarto giorno dopo il parto (PND 4).

31. Un diagramma del calendario della prova è contenuto nell'appendice 2.

Procedura di accoppiamento

32. Nel presente studio si utilizza normalmente il sistema di accoppiamento 1:1 (un maschio per una femmina). Possono essere previste eccezioni in caso di morte occasionale di esemplari maschi. Si deve mettere una femmina con lo stesso maschio fino a quando la copulazione è comprovata o sono trascorse due settimane. Ogni mattina le femmine devono essere esaminate per verificare la presenza di sperma o di tappi vaginali. Il giorno 0 della gravidanza è definito come il giorno in cui si riscontra la prova dell'avvenuta copulazione (presenza di un tappo vaginale o di sperma). Nel caso in cui l'accoppiamento non abbia successo, si può valutare la possibilità di far accoppiare le femmine con maschi di comprovata capacità riproduttiva dello stesso gruppo.

Dimensioni della nidiata

33. Il quarto giorno dopo la nascita è possibile uniformare le dimensioni di ogni nidiata eliminando i piccoli in eccesso tramite selezione casuale, in modo da ottenere, nella misura del possibile, quattro o cinque piccoli per sesso per ciascuna nidiata, a seconda delle dimensioni normali della nidiata nei ceppi di ratti utilizzati. I campioni di sangue devono essere prelevati da due dei piccoli in eccedenza, raggruppati e utilizzati per determinare i livelli sierici di T4. L'eliminazione selettiva dei piccoli, ad esempio in base al peso corporeo o alla distanza anogenitale (AGD), non è opportuna. Ogni volta che il numero di piccoli maschi o femmine non permette di avere quattro o cinque animali di ciascun sesso per nidiata, è accettabile una regolazione parziale (ad esempio, sei maschi e quattro femmine). Se le dimensioni della nidiata scendono al di sotto della soglia di uniformazione (8 o 10 piccoli per ciascuna nidiata), nessun piccolo sarà eliminato. Qualora vi sia un solo piccolo al di sopra della soglia di uniformazione, esso sarà eliminato e utilizzato per prelevare il campione di sangue ai fini della determinazione dei livelli sierici di T4.

34. Se le dimensioni della nidiata non sono uniformate, si sacrificano due piccoli per nidiata il quarto giorno dopo la nascita e si prelevano campioni di sangue per valutare la concentrazione sierica degli ormoni tiroidei. Se possibile, nel selezionare i due piccoli per nidiata da sacrificare, scegliere due femmine per tenere da parte i maschi per la valutazione della retrazione del capezzolo, tranne nel caso in cui l'eliminazione di questi piccoli non lasci alcuna femmina per le valutazioni da effettuare al termine. Non bisogna eliminare alcun piccolo se vi sono meno di 8 o 10 piccoli per nidiata (a seconda delle dimensioni normali della nidiata nei ceppi di ratti utilizzati). Qualora vi sia un solo piccolo in più rispetto alle dimensioni normali della nidiata, un solo piccolo sarà eliminato e utilizzato per prelevare il campione di sangue ai fini della determinazione dei livelli sierici di T4.

Osservazioni in vivo

Osservazioni cliniche

35. Durante l'intero periodo della prova, le osservazioni cliniche generali vanno effettuate almeno una volta al giorno, con una frequenza maggiore se si constatano segni di tossicità. Le osservazioni devono essere effettuate preferibilmente ogni giorno alla stessa ora, tenendo conto del periodo probabile di massima intensità degli effetti dopo la somministrazione. Si devono registrare tutte le variazioni comportamentali pertinenti, i segni di parto difficile o prolungato e tutti i sintomi di tossicità, compresa la mortalità. Le registrazioni devono includere il momento dell'insorgenza, la gravità e la durata degli effetti tossici.

Peso corporeo e consumo di cibo/acqua

36. I maschi e le femmine devono essere pesati il primo giorno della somministrazione, in seguito almeno settimanalmente, e al termine della somministrazione. Le femmine devono essere pesate durante la gravidanza i giorni 0, 7, 14 e 20 ed entro 24 ore dal parto (giorno 0 o 1 dopo il parto) e almeno il quarto e il tredicesimo giorno dopo il parto. Queste osservazioni vanno riportate singolarmente per ciascun animale adulto.

37. Durante il periodo precedente l'accoppiamento e durante la gravidanza e l'allattamento, l'assunzione di cibo deve essere misurata almeno una volta alla settimana. La misurazione dell'assunzione di cibo durante l'accoppiamento è facoltativa. Se la sostanza chimica in esame è somministrata con acqua da bere, durante questi periodi va misurata anche l'assunzione di acqua.

Cicli estrali

38. I cicli estrali devono essere monitorati prima dell'inizio del trattamento per selezionare per lo studio femmine aventi una ciclicità regolare (cfr. il paragrafo 22). Vanno monitorati anche gli strisci vaginali, ogni giorno dall'inizio del periodo di trattamento finché l'accoppiamento non risulti avvenuto. Se vi è il sospetto che effetti legati a forte stress all'inizio del trattamento possano alterare i cicli estrali, i laboratori possono esporre gli animali utilizzati nella prova per due settimane e quindi effettuare ogni giorno strisci vaginali per monitorare il ciclo estrale per almeno due settimane iniziando nel periodo precedente l'accoppiamento e proseguendo durante il periodo dell'accoppiamento finché quest'ultimo non risulti avvenuto. Durante il prelievo delle cellule vaginali/cervicali occorre prestare attenzione a non ledere la mucosa per evitare un'eventuale induzione di pseudogravidanza (7) (8).

Parametri relativi alla progenie

39. La durata della gestazione deve essere registrata e calcolata dal giorno 0 di gravidanza. Ogni nidiata deve essere esaminata non appena possibile dopo il parto per stabilire il numero e il sesso dei piccoli, dei nati morti, dei nati vivi e degli esemplari più piccoli del normale (i piccoli di dimensioni molto inferiori ai corrispondenti piccoli di controllo) e la presenza di grosse anomalie.

40. Si procede a contare i piccoli vivi e a identificarne il sesso e a pesare le nidiate entro 24 ore dal parto (giorno 0 o 1 dopo il parto) e almeno il quarto e il tredicesimo giorno dopo il parto. Oltre a quanto osservato al paragrafo 35, deve essere registrato qualsiasi comportamento anomalo della prole.

41. Occorre misurare la distanza anogenitale (AGD) di ogni piccolo nello stesso giorno dalla nascita, tra il PND 0 e il PND 4. Il peso corporeo del piccolo va registrato il giorno in cui ne viene misurata l'AGD, che deve essere normalizzata in funzione della taglia, preferibilmente usando la radice cubica del peso corporeo (9). Va contato il numero di capezzoli/areole nei piccoli di sesso maschile il PND 12 o 13, come raccomandato nella linea guida n. 151 dell'OCSE (10).

Biochimica clinica

42. Vanno prelevati campioni di sangue da un sito specifico in base al seguente programma:

— da almeno due piccoli per nidiata il quarto giorno dopo la nascita, se il numero di piccoli lo consente (cfr. i paragrafi 33-34)

— da tutte le madri e almeno due piccoli di 13 giorni per nidiata al termine dell'esperimento e

— da tutti i maschi adulti, al termine dell'esposizione.

Tutti i campioni di sangue vanno conservati in condizioni adeguate. Si procede alla valutazione della concentrazione sierica per gli ormoni tiroidei (T4) nei campioni di sangue dei piccoli di 13 giorni e degli adulti maschi. Se del caso, si effettua un'ulteriore valutazione dell'ormone T4 nei campioni di sangue delle madri e dei piccoli di 4 giorni. Se opportuno, si possono misurare facoltativamente anche i livelli di altri ormoni. I prelievi di sangue dei piccoli possono essere raggruppati per nidiata ai fini dell'analisi degli ormoni tiroidei. Gli ormoni tiroidei (T4 e TSH) sono misurati di preferenza come «totale».

43. I fattori seguenti possono influenzare la variabilità e le concentrazioni assolute delle analisi ormonali:

— momento della soppressione, per via della variazione diurna delle concentrazioni ormonali;

— metodi di soppressione, evitando di stressare inutilmente gli animali in quanto ciò potrebbe incidere sulle concentrazioni ormonali;

— kit per le analisi ormonali che possono differire per le loro curve standard.

44. I campioni di plasma destinati specificatamente all'analisi ormonale devono essere prelevati nelle stesse ore della giornata. I valori numerici ottenuti dalle analisi delle concentrazioni ormonali differiscono in funzione dei kit disponibili in commercio utilizzati.

Patologia

Necroscopia macroscopica

45. Al momento della soppressione o del decesso durante lo studio va effettuato un esame macroscopico dei soggetti adulti alla ricerca di eventuali anomalie o alterazioni patologiche. Occorre prestare particolare attenzione agli organi dell'apparato riproduttivo e prendere nota del numero dei siti di impianto. Gli strisci vaginali devono essere esaminati al mattino il giorno della necroscopia per determinare lo stadio del ciclo estrale e consentire di stabilire correlazioni con l'istopatologia delle ovaie.

46. Testicoli ed epididimi, come pure l'insieme composto dalla prostata e dalle vescicole seminali con le ghiandole della coagulazione, di tutti i maschi adulti vanno opportunamente liberati da eventuali tessuti aderenti e pesati umidi immediatamente dopo la dissezione, per evitare l'essiccamento. Inoltre, si possono pesare facoltativamente altri organi, come l'insieme del muscolo elevatore dell'ano e del muscolo bulbocavernoso, le ghiandole bulbouretrali e il glande nei maschi e le due ovaie (peso a umido) e l'utero (compresa la cervice) nelle femmine; se effettuate, queste misurazioni facoltative devono avvenire subito dopo la dissezione.

47. I piccoli morti o soppressi il tredicesimo giorno dopo il parto, o poco dopo, devono essere sottoposti almeno a un attento esame esterno volto a individuare eventuali anomalie evidenti. Particolare attenzione deve essere dedicata all'apparato riproduttivo esterno, che va esaminato alla ricerca di eventuali alterazioni dello sviluppo. Il tredicesimo giorno bisogna conservare la tiroide di 1 piccolo maschio e di 1 piccolo femmina per nidiata.

48. Le ovaie, i testicoli, gli organi sessuali accessori (utero e cervice, epididimi, prostata, vescicole seminali con ghiandole di coagulazione), la tiroide e tutti gli organi degli animali adulti che presentano lesioni macroscopiche devono essere conservati. La fissazione in formalina è sconsigliata per l'esame di routine di testicoli ed epididimi. Un metodo accettabile per questi tessuti è l'uso del liquido fissativo di Bouin o del liquido fissativo di Davidson modificato (11). La tunica albuginea può essere perforata, con un ago, con delicatezza e superficialmente in entrambi i poli dell'organo per consentire la rapida penetrazione del fissativo.

Esame istopatologico

49. Va eseguito un esame istologico dettagliato di ovaie, testicoli ed epididimi (con particolare attenzione alle fasi della spermatogenesi e dell'istopatologia della struttura delle cellule interstiziali dei testicoli) degli animali del gruppo cui viene somministrata la dose più elevata e del gruppo di controllo. Gli altri organi conservati, compresa la tiroide dei piccoli e degli animali adulti, possono essere esaminati se necessario. Il peso della tiroide può essere stabilito dopo la fissazione. Anche in questo caso l'ablazione deve essere eseguita con cautela e solo previa fissazione per evitare di danneggiare i tessuti. L'eventuale danneggiamento dei tessuti infatti potrebbe compromettere l'analisi istopatologica. Si procede a questi esami anche sugli animali degli altri gruppi trattati se nel gruppo cui viene somministrata la dose più elevata si osservano alterazioni. Il documento di orientamento sull'istopatologia (11) fornisce informazioni supplementari sulla dissezione, la fissazione, l'asportazione e l'istopatologia dei tessuti endocrini.

DATI E RELAZIONE

Dati

50. Devono essere forniti dati individuali su ciascun animale. Inoltre, tutti i dati vanno riassunti sotto forma di tabella, evidenziando per ciascun gruppo di studio il numero di animali all'inizio della prova, il numero di animali rinvenuti morti durante la prova o sottoposti a eutanasia, il momento di eventuali decessi o soppressioni, il numero di animali fertili, il numero di femmine gravide, il numero di animali che mostrano segni di tossicità, una descrizione dei segni di tossicità osservati, ivi compresi il momento dell'insorgenza, la durata e la gravità degli effetti tossici, i tipi di alterazioni istopatologiche, nonché tutti i dati di rilievo riguardanti le nidiate. Un formato tabulare di relazione sintetica che si è rivelato molto utile per la valutazione degli effetti sulla riproduzione/sullo sviluppo è contenuto nell'appendice 3.

51. Tenuto conto della portata ridotta dello studio, le analisi statistiche sotto forma di prove intese ad accertare la «significatività» dei risultati hanno un valore limitato per molti endpoint, soprattutto quelli riproduttivi. Se si ricorre ad analisi statistiche, il metodo scelto deve essere adatto alla distribuzione della variabile esaminata e selezionato prima di iniziare lo studio. L'analisi statistica dell'AGD e della retrazione del capezzolo deve essere basata sui dati individuali dei piccoli, tenendo conto degli effetti sulle nidiate. Se opportuno, utilizzare la nidiata come unità di analisi. L'analisi statistica del peso corporeo dei piccoli deve essere basata sui dati individuali dei piccoli, tenendo conto delle dimensioni della nidiata. A causa delle dimensioni ridotte del gruppo, può essere utile anche rifarsi ad eventuali dati di controllo storici (ad esempio, per le dimensioni della nidiata) per facilitare l'interpretazione dei dati emersi dallo studio.

Valutazione dei risultati

52. I risultati del presente studio di tossicità vanno valutati in base agli effetti osservati e ai risultati della necroscopia e dell'esame microscopico. La valutazione deve includere il rapporto fra la dose della sostanza chimica in esame e la presenza o l'assenza, l'incidenza e la gravità delle anomalie, comprese eventuali lesioni macroscopiche, gli organi bersaglio identificati, l'infertilità, le anomalie cliniche, la capacità riproduttiva, gli effetti sulla generazione successiva, le alterazioni del peso corporeo, gli effetti sulla mortalità ed eventuali altri effetti tossici.

53. Tenuto conto del breve periodo di trattamento del maschio, l'istopatologia dei testicoli e degli epididimi deve essere considerata insieme ai dati sulla fertilità nel quadro della valutazione degli effetti sulla riproduzione del maschio. Può essere utile anche utilizzare eventuali dati di controllo storici sulla riproduzione/lo sviluppo (ad esempio per le dimensioni della nidiata, l'AGD, la retrazione del capezzolo, i livelli sierici di T4) per facilitare l'interpretazione dello studio.

54. Ai fini del controllo di qualità, si suggerisce di raccogliere dati di controllo storici e di calcolare i coefficienti di variazione per i dati numerici, in particolare per i parametri legati all'individuazione degli interferenti endocrini. Questi dati possono essere utilizzati, a fini di confronto, in fase di valutazione degli studi effettivamente realizzati.

Relazione sull'esecuzione della prova

55. La relazione sull'esecuzione della prova deve comprendere le seguenti informazioni:

Sostanza chimica in esame:

— origine, numero di lotto, data limite per l'uso, se disponibili;

— stabilità della sostanza chimica in esame, se nota;

Sostanza monocostituente:

— aspetto fisico, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche;

— dati di identificazione chimica: denominazioni IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula strutturale, purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc.;

Sostanza multicostituente, UVCB e miscele:

— caratterizzate nella massima misura possibile con l'identità chimica (cfr. sopra), con la presenza quantitativa e con le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti;

Mezzo disperdente (se del caso):

— giustificazione per la scelta del mezzo disperdente utilizzato, se diverso dall'acqua;

Animali utilizzati nella prova:

— specie/ceppo impiegati;

— numero, età e sesso degli animali;

— origine, condizioni di alloggio, dieta, ecc.;

— peso di ciascun animale all'inizio della prova;

— qualora non siano stati utilizzati ratti, spiegazione del motivo;

Condizioni sperimentali:

— criteri di selezione delle dosi;

— informazioni dettagliate sulla formulazione della sostanza chimica in esame/preparazione della dieta, sulle concentrazioni finali, sulla stabilità e sull'omogeneità del preparato;

— modalità precise di somministrazione della sostanza chimica in esame;

— se del caso, conversione della concentrazione della sostanza nella dieta o nell'acqua (ppm) in dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno);

— dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua;

— descrizione dettagliata del protocollo di randomizzazione utilizzato per selezionare gli eventuali piccoli da sopprimere;

Risultati:

— peso corporeo/cambiamenti del peso corporeo;

— assunzione di cibo ed eventualmente di acqua;

— dati sulla risposta tossica per sesso e per dose, compresi i dati sulla fertilità, la gestazione ed eventuali altri sintomi di tossicità;

— durata della gestazione,

— effetti tossici o di altro tipo sulla riproduzione, sulla prole, sulla crescita postnatale, ecc.;

— natura, gravità e durata dei segni clinici (sia reversibili che non reversibili);

— numero di femmine adulte con ciclo estrale normale o anomalo e durata del ciclo;

— numero di nati vivi e di perdite post-impianto;

— dati relativi al peso corporeo dei piccoli;

— AGD di tutti i piccoli (e peso corporeo il giorno della misurazione dell'AGD);

— retrazione del capezzolo nei piccoli di sesso maschile;

— livelli degli ormoni tiroidei, piccoli di 13 giorni e maschi adulti (e madri e piccoli di 4 giorni se sottoposti a misurazione);

— numero di piccoli con anomalie evidenti, valutazione macroscopica degli organi genitali esterni, numero di esemplari più piccoli del normale;

— momento del decesso durante lo studio o indicazione della sopravvivenza degli animali alla conclusione della prova;

— numero di impianti e dimensioni e peso della nidiata al momento della registrazione;

— peso corporeo al momento della soppressione e dati sul peso degli organi negli animali genitori;

— risultati della necroscopia;

— descrizione dettagliata dei risultati istopatologici;

— dati sull'assorbimento (se disponibili);

— elaborazione statistica dei risultati, se del caso.

Discussione dei risultati

Conclusioni

Interpretazione dei risultati

56. Lo studio fornirà valutazioni della tossicità per la riproduzione/lo sviluppo associata alla somministrazione di dosi ripetute (cfr. i paragrafi 5 e 6). Esso può fornire indicazioni sulla necessità di condurre ulteriori indagini e fornisce orientamenti in merito alla progettazione di studi successivi. Si consulti il documento di orientamento n. 43 dell'OCSE per indicazioni sull'interpretazione dei risultati in merito alla riproduzione e allo sviluppo (12). Il documento di orientamento n. 106 dell'OCSE sulla valutazione istologica delle prove endocrine e sulla riproduzione nei roditori (11) fornisce informazioni sulla preparazione e la valutazione degli organi (endocrini) e degli strisci vaginali che possono essere utili per questa linea guida.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic and Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Available Upon Request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Available Upon Request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(6) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment(No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.

(8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(9) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L.(1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No106), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Appendice 1

DEFINIZIONI (CFR. ANCHE LA LINEA GUIDA N. 150 DELL'OCSE (6))

Androgenicità: la capacità di una sostanza chimica di agire come un ormone androgenico naturale (ad es. il testosterone) in un mammifero.

Antiandrogenicità: la capacità di una sostanza chimica di inibire l'attività di un ormone androgenico naturale (ad es. il testosterone) in un mammifero.

Antiestrogenicità: la capacità di una sostanza chimica di inibire l'attività di un ormone estrogenico naturale (ad es. l'estradiolo 17ß) in un mammifero.

Attività antitiroidea: la capacità di una sostanza chimica di inibire l'attività di un ormone tiroideo naturale (ad es. $T_{3)}$ in un mammifero.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Tossicità per lo sviluppo: la manifestazione della tossicità per la riproduzione, che risulta in disturbi prenatali, perinatali, postnatali, strutturali o funzionali nella progenie.

Dosaggio: termine generale che ricomprende la dose, la frequenza e la durata della somministrazione.

Dose: quantità di sostanza chimica somministrata. La dose è espressa come peso della sostanza chimica in esame per unità di peso corporeo dell'animale utilizzato nella prova per giorno (mg/kg peso corporeo/giorno) o come una concentrazione costante nella dieta.

Tossicità evidente: termine generale che designa i segnali evidenti di tossicità a seguito della somministrazione di una sostanza chimica. Questi segni devono essere sufficienti per consentire la valutazione dei pericoli ed essere tali che si possa prevedere che l'aumento della dose somministrata comporti la comparsa di segni di tossicità grave e probabilmente la mortalità.

Compromissione della fertilità: i disturbi delle funzioni o della capacità riproduttive maschili o femminili.

Tossicità materna: gli effetti nocivi sulle femmine gravide, che si verificano in modo specifico (effetto diretto) o non specifico (effetto indiretto).

NOAEL: l'abbreviazione di *no-observed-adverse-effect level*, ossia la dose più elevata alla quale non si osservano effetti avversi legati al trattamento.

Estrogenicità: la capacità di una sostanza chimica di agire come un ormone estrogenico naturale (ad es. l'estradiolo 17ß) in un mammifero.

Tossicità della riproduzione: gli effetti nocivi sulla progenie e/o la compromissione delle funzioni o della capacità riproduttive maschili e femminili.

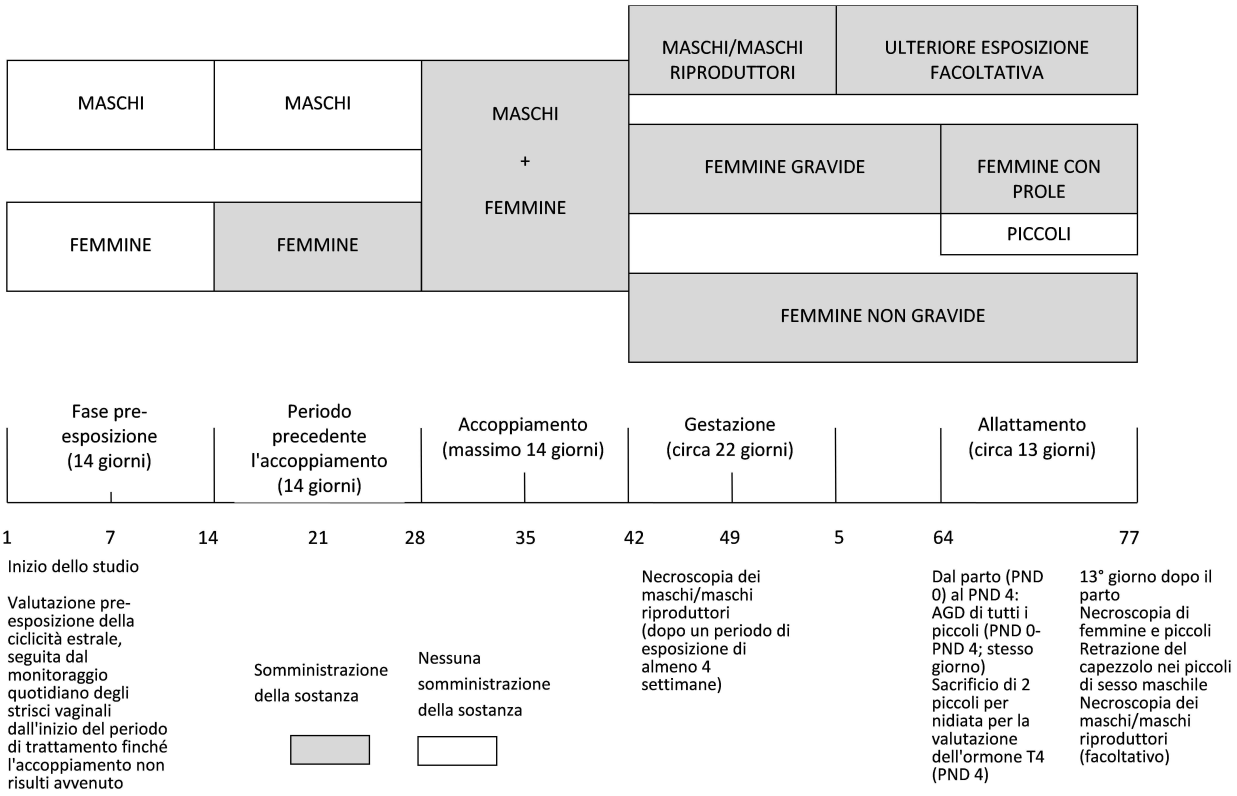
Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela saggiata seguendo il presente metodo di prova.

Attività tiroidea: la capacità di una sostanza chimica di agire come un ormone tiroideo naturale (ad es. $T_{3)}$ in un mammifero.

Validazione: processo scientifico destinato a caratterizzare i requisiti e i limiti operativi di un metodo di prova e a dimostrarne l'affidabilità e la pertinenza per un fine specifico.

Appendice 2

DIAGRAMMA DEL PROTOCOLLO SPERIMENTALE INDICANTE LA DURATA MASSIMA DELLO STUDIO, BASATO SU UN PERIODO DI ACCOPPIAMENTO COMPLETO DI 14 GIORNI



Appendice 3

RELAZIONE SINTETICA IN FORMATO TABULARE DEGLI EFFETTI SULLA RIPRODUZIONE/SULLO SVILUPPO

OSSERVAZIONI	VALORI				
Dosaggio (unità)	0 (controllo)	...	...	...	...
Coppie formate (N)					
Ciclo estrale (almeno durata media e frequenza dei cicli irregolari)					
Femmine per le quali la copulazione risulta avvenuta (N)					
Femmine gravide (N)					
Giorni di concepimento 1 - 5 (N)					
Giorni di concepimento 6 -...[1] (N)					
Gravidanza ≤ 21 giorni (N)					
Gravidanza = 22 giorni (N)					
Gravidanza ≥ 23 giorni (N)					
Madri che hanno partorito piccoli vivi (N)					
Madri con piccoli vivi il quarto giorno dopo il parto (N)					
Impianti/madre (media)					
Piccoli vivi/madre alla nascita (media)					
Piccoli vivi/madre al quarto giorno (media)					
Rapporto numerico tra i sessi (m/f) alla nascita (media)					
Rapporto numerico tra i sessi (m/f) al quarto giorno (media)					
Peso della nidiata alla nascita (media)					
Peso della nidiata al quarto giorno (media)					
Peso dei piccoli alla nascita (media)					
Peso dei piccoli al momento della misurazione dell'AGD (media maschi, media femmine)					

OSSERVAZIONI	VALORI				
Dosaggio (unità)	0 (controllo)	...	...	...	...
AGD dei piccoli misurata lo stesso giorno dalla nascita, tra la nascita e il giorno 4 (media maschi, media femmine, prendere nota del PND)					
Peso dei piccoli al quarto giorno (media)					
Retrazione del capezzolo dei piccoli maschi al tredicesimo giorno (media)					
Peso dei piccoli al tredicesimo giorno (media)					
PICCOLI CON ANOMALIE					
Madri con 0					
Madri con 1					
Madri con ≥ 2					
PERDITA DELLA PROGENIE					
Perdite prenatali/dopo l'impianto (impianti meno piccoli nati vivi)					
Femmine con 0					
Femmine con 1					
Femmine con 2					
Femmine con ≥ 3					
Perdite postnatali (piccoli nati vivi meno piccoli vivi il tredicesimo giorno dopo il parto)					
Femmine con 0					
Femmine con 1					
Femmine con 2					
Femmine con ≥ 3					

(1) Ultimo giorno del periodo di accoppiamento

B.64 STUDIO DI TOSSICITÀ CON DOSE RIPETUTA COMBINATO CON LA PROVA DI SCREENING DELLA TOSSICITÀ PER LA RIPRODUZIONE/LO SVILUPPO

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida n. 422 dell'OCSE (2016). Le linee guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche sono periodicamente rivedute e aggiornate alla luce del progresso scientifico. La linea guida n. 422 sulla prova di screening è stata adottata inizialmente nel 1996, sulla base di un protocollo per una «prova di screening della tossicità con dose ripetuta combinata con una prova di screening della tossicità per la riproduzione e lo sviluppo» di cui si è discusso nell'ambito di due riunioni di esperti, a Londra nel 1990 (1) e a Tokyo nel 1992 (2).

2. Il presente metodo di prova consta di una parte in cui è effettuato uno screening della tossicità per la riproduzione/lo sviluppo, basata sull'esperienza acquisita negli Stati membri attraverso l'utilizzo del metodo originario con le sostanze chimiche esistenti a elevato volume di produzione e la conduzione di prove esplorative con sostanze utilizzate come controllo positivo (3) (4), e di una parte in cui viene esaminata la tossicità mediante prove con dosi ripetute, conformemente alla linea guida per le prove n. 407 dell'OCSE (studio della tossicità orale con somministrazione ripetuta di dosi per 28 giorni sui roditori, corrispondente al capitolo B.7 del presente allegato).

3. Il presente metodo di prova è stato aggiornato mediante l'aggiunta di endpoint pertinenti per il rilevamento di interferenti endocrini, come seguito all'attività ad alta priorità avviata dall'OCSE nel 1998 volta a rivedere le linee guida esistenti e a elaborarne di nuove, per lo screening e la sperimentazione relativi a potenziali interferenti endocrini (5). In tale contesto, la linea guida n. 407 dell'OCSE (che corrisponde al capitolo B.7 del presente allegato) è stata migliorata nel 2008 mediante l'aggiunta di parametri adatti per l'individuazione dell'attività endocrina delle sostanze chimiche in esame. La linea guida n. 422 è stata aggiornata con l'intento di includere gli endpoint pertinenti per il rilevamento di interferenti endocrini nelle linee guida in cui i periodi di esposizione coprono alcuni dei periodi sensibili dello sviluppo (i periodi precedenti o immediatamente successivi alla nascita).

4. Gli ulteriori endpoint pertinenti per il rilevamento di interferenti endocrini selezionati, che fanno parte anche della linea guida n. 443 (studio esteso di tossicità per la riproduzione su una generazione, corrispondente al capitolo B.56 del presente allegato), sono stati aggiunti alla linea guida n. 422 sulla base di uno studio di fattibilità riguardante questioni scientifiche e tecniche relative alla loro inclusione, come pure gli eventuali adattamenti del disegno sperimentale necessari per la loro inclusione (6).

5. Il presente metodo di prova è inteso a generare informazioni limitate concernenti gli effetti delle sostanze chimiche in esame sulla capacità riproduttiva maschile e femminile, quali la funzione delle gonadi, il comportamento in fase di accoppiamento, il concepimento, lo sviluppo dell'organismo concepito e il parto. Esso non rappresenta un'alternativa ai metodi di prova esistenti B.31, B.34, B.35 e B.56, né li sostituisce.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

6. Nella valutazione e nell'esame delle caratteristiche tossiche di una sostanza chimica è possibile determinare la tossicità orale utilizzando dosi ripetute dopo aver ottenuto dati preliminari sulla tossicità mediante prove di tossicità acuta. Il presente studio fornisce informazioni sui rischi che l'esposizione ripetuta per un periodo di tempo relativamente limitato può comportare per la salute. Il metodo prevede uno studio di base della tossicità a dosi ripetute che può essere utilizzato per le sostanze chimiche per le quali uno studio di 90 giorni non si giustifica (ad esempio quando il volume di produzione non supera determinate quantità) o prima di uno studio a lungo termine. Durante lo svolgimento dello studio è opportuno seguire i principi guida e le considerazioni di cui al documento di orientamento dell'OCSE n. 19, *Recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation* (7).

7. Esso comprende inoltre una prova di screening della tossicità per la riproduzione/lo sviluppo e, pertanto, può essere utilizzato anche per fornire informazioni iniziali sui possibili effetti sulla capacità riproduttiva maschile e femminile, quali la funzione delle gonadi, il comportamento in fase di accoppiamento, il concepimento, lo sviluppo dell'organismo concepito e il parto, nella fase iniziale di valutazione delle proprietà tossicologiche delle sostanze chimiche o nella valutazione di sostanze potenzialmente pericolose. Il presente metodo di prova non fornisce informazioni complete su tutti gli aspetti della riproduzione e dello sviluppo. In particolare, esso offre solo mezzi limitati per individuare manifestazioni postnatali di un'esposizione prenatale o effetti eventualmente riconducibili a un'esposizione postnatale. Tenuto conto (tra le altre cose) della selettività degli endpoint e della breve durata dello studio, il presente metodo non fornisce prove sufficienti per trarre conclusioni definitive circa l'assenza di effetti sulla riproduzione o lo sviluppo. Inoltre, in assenza di dati desunti da altre prove di tossicità per la riproduzione/lo sviluppo, risultati positivi sono utili per una valutazione iniziale dei pericoli e permettono di prendere decisioni circa la necessità di procedere a ulteriori prove e i tempi per effettuarle.

8. I risultati ottenuti per quanto riguarda i parametri endocrini devono essere interpretati alla luce del «Quadro concettuale dell'OCSE per le prove e la valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino» (8). La linea guida migliorata dell'OCSE n. 422 fa parte del livello 4 di questo quadro concettuale come saggio *in vivo* in grado di fornire dati sugli effetti nocivi sugli endpoint pertinenti per il sistema endocrino. Un segnale endocrino potrebbe tuttavia non essere considerato di per sé una prova sufficiente ad attestare che la sostanza chimica in esame è un interferente endocrino.

9. Il presente metodo di prova attribuisce inoltre particolare importanza agli effetti neurologici in quanto parametro specifico di valutazione e comporta la necessità di un'accurata osservazione clinica degli animali per ottenere il maggior numero possibile di informazioni. Tale metodo è finalizzato all'individuazione di sostanze chimiche dotate di un potenziale neurotossico, che potranno successivamente richiedere indagini più approfondite al riguardo. Inoltre, il metodo può fornire anche un'indicazione di base degli effetti immunologici.

10. In assenza di dati desunti da altri studi sulla tossicità sistemica, la tossicità per la riproduzione/lo sviluppo, la neurotossicità e/o l'immunotossicità, risultati positivi sono utili per una valutazione iniziale dei pericoli e permettono di prendere decisioni circa la necessità di procedere a ulteriori prove e i tempi per effettuarle. La prova può essere particolarmente utile nell'ambito delle serie di dati di informazione di monitoraggio dell'OCSE per la valutazione delle sostanze chimiche esistenti per le quali le informazioni tossicologiche sono scarse o inesistenti e può essere utilizzata come alternativa alla conduzione di due prove distinte, rispettivamente per la tossicità a dosi ripetute (linea guida n. 407 dell'OCSE, corrispondente al capitolo B.7 del presente allegato) e la tossicità per la riproduzione/lo sviluppo (linea guida n. 421 dell'OCSE, corrispondente al capitolo B.63 del presente allegato). Può essere utilizzata anche come studio di determinazione degli intervalli di dosaggio per studi più approfonditi sulla riproduzione o sullo sviluppo o in altri casi in cui sia ritenuto opportuno.

11. In genere, si presuppone che vi siano differenze a livello di sensibilità tra le femmine gravide e quelle non gravide. Di conseguenza, rispetto alla conduzione di prove distinte, in questa prova combinata può essere più complicato determinare i livelli di dosaggio adeguati per valutare sia la tossicità sistemica generale sia la tossicità specifica per la riproduzione/lo sviluppo. Inoltre, rispetto alla conduzione di uno studio a dosi ripetute, l'interpretazione dei risultati della prova per quanto riguarda la tossicità sistemica generale può essere più difficile, soprattutto quando i parametri sierici e istopatologici non sono valutati contemporaneamente nello studio. A causa di queste complessità tecniche, per eseguire questa prova di screening combinata è richiesta molta esperienza nella conduzione di prove di tossicità. Dall'altro lato, oltre a coinvolgere un numero inferiore di animali, la prova combinata può consentire di distinguere meglio gli effetti diretti sulla riproduzione/lo sviluppo da quelli secondari rispetto ad altri effetti (sistemici).

12. Il periodo di esposizione di questa prova è più lungo rispetto a quello di un convenzionale studio a dosi ripetute di 28 giorni. Tuttavia, il numero di animali di ciascun sesso per gruppo è inferiore a quello utilizzato nel caso di un convenzionale studio a dosi ripetute di 28 giorni condotto in aggiunta a una prova di screening della tossicità per la riproduzione/lo sviluppo.

13. Il presente metodo di prova prevede la somministrazione orale della sostanza chimica da esaminare. Potrebbero essere necessarie modifiche in caso di utilizzo di altre vie di somministrazione.

14. Prima di applicare il presente metodo di prova a una miscela per generare dati ai fini regolamentari previsti, si deve considerare se, e in caso affermativo, perché, esso possa fornire risultati adeguati a tale scopo. Tali considerazioni non sono necessarie laddove esista una disposizione normativa che obblighi a sottoporre a prova la miscela.

15. L'appendice 1 contiene le definizioni dei termini utilizzati.

PRINCIPIO DELLA PROVA

16. La sostanza chimica in esame viene somministrata in dosi graduate a diversi gruppi di maschi e femmine. Ai maschi le dosi devono essere somministrate per almeno quattro settimane e fino al giorno precedente alla soppressione programmata, compreso tale giorno (tale periodo comprende un minimo di due settimane prima dell'accoppiamento, il tempo dell'accoppiamento e circa due settimane dopo l'accoppiamento). Tenuto conto della breve durata del periodo di esposizione prima dell'accoppiamento nei maschi, la fertilità potrebbe non essere un particolare indicatore di sensibilità per la tossicità testicolare. È pertanto essenziale un esame istologico particolareggiato delle prove. La combinazione di un periodo di esposizione di due settimane prima dell'accoppiamento (seguito da osservazioni

sull'accoppiamento e la fertilità) e di un periodo di esposizione complessivo di almeno quattro settimane (seguito da un dettagliato esame istopatologico delle gonadi maschili) è considerata sufficiente a consentire l'individuazione della maggior parte degli effetti sulla fertilità maschile e sulla spermatogenesi.

17. Alle femmine la sostanza va somministrata durante l'intero studio. Tale periodo comprende due settimane prima dell'accoppiamento (con l'obiettivo di coprire almeno due cicli estrali completi), l'intervallo variabile che precede il concepimento, la durata della gestazione e almeno tredici giorni dopo il parto, fino al giorno precedente alla soppressione programmata, compreso tale giorno.

18. La durata dello studio, dopo l'acclimatazione e la valutazione del ciclo estrale precedente la somministrazione, dipende dal comportamento della femmina ed è di circa 63 giorni [almeno 14 giorni prima dell'accoppiamento, un massimo di 14 giorni per l'accoppiamento, 22 giorni di gestazione, 13 giorni di allattamento].

19. Durante il periodo di somministrazione gli animali vengono esaminati attentamente e quotidianamente al fine di rilevare eventuali segni di tossicità. Gli animali deceduti o soppressi durante l'esperimento vengono sottoposti a necroscopia; al termine della prova gli animali superstiti vengono soppressi e sottoposti a necroscopia.

DESCRIZIONE DEL METODO

Selezione della specie animale

20. Il presente metodo di prova è destinato ad essere utilizzato con i ratti. Se i parametri specificati nella presente linea guida n. 422 sono studiati in un'altra specie di roditori occorre fornire una giustificazione dettagliata. Nel programma internazionale di validazione per l'individuazione degli interferenti endocrini nella linea guida n. 407 il ratto è stata l'unica specie animale utilizzata. Non vanno usati ceppi a bassa fecondità o con nota elevata incidenza di difetti dello sviluppo. Si devono utilizzare animali vergini sani, non sottoposti in precedenza a esperimenti. Gli animali utilizzati nella prova devono essere caratterizzati quanto alle specie, al ceppo, al sesso, al peso e all'età. All'inizio dello studio la variazione ponderale degli animali utilizzati deve essere minima e non superare il 20 % circa del peso medio di ciascun sesso. Per gli studi preliminari a studi a lungo termine o effettuati su un'intera generazione, è preferibile ricorrere in entrambi gli studi ad animali dello stesso ceppo e della stessa provenienza.

Condizioni di stabulazione e alimentazione

21. Tutte le procedure devono attenersi agli standard locali in materia di cura degli animali da esperimento. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). L'umidità relativa deve essere non inferiore al 30 % e, preferibilmente, non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia dei locali. L'illuminazione deve essere artificiale, con un fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 ore di oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata di acqua da bere. La scelta della dieta può essere influenzata dalla necessità di garantire un'adeguata miscela della sostanza chimica in esame, se quest'ultima è somministrata con il cibo.

22. Gli animali devono essere sistemati nelle gabbie in piccoli gruppi dello stesso sesso; possono essere sistemati in gabbie individuali se necessario per ragioni scientifiche. Ciascuna gabbia non deve ospitare più di cinque animali. L'accoppiamento va effettuato in gabbie adeguate allo scopo. Le femmine gravide devono essere tenute in gabbie individuali e rifornite di materiale per la costruzione della tana. Le femmine che allattano vanno poste in gabbie individuali insieme alla prole.

23. L'alimentazione deve essere analizzata periodicamente per verificare la presenza di contaminanti. Un campione del mangime somministrato deve essere conservato fino al completamento della relazione.

Preparazione degli animali

24. Vengono scelti a caso soggetti giovani adulti destinati ai gruppi di trattamento e alle gabbie. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. Gli animali vanno identificati inequivocabilmente e acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno cinque giorni prima dell'inizio dello studio.

Preparazione delle dosi

25. Si raccomanda di somministrare la sostanza chimica in esame per via orale, a meno che non si considerino più appropriate altre vie di somministrazione. Se si sceglie la via orale, la sostanza chimica è generalmente somministrata mediante sonda gastrica; tuttavia, in alternativa, può essere somministrata anche con la dieta o l'acqua da bere.

26. Ove necessario, la sostanza in esame è disciolta o sospesa in un mezzo disperdente adeguato. Si raccomanda di prendere anzitutto in considerazione, ogni qualvolta possibile, l'uso di una soluzione/sospensione acquosa, e in seconda battuta quello di una soluzione/sospensione in olio (ad esempio olio di semi di mais) e infine la possibile soluzione in altri mezzi disperdenti. Le caratteristiche tossiche dei mezzi disperdenti non acquosi devono essere note. È necessario determinare la stabilità e l'omogeneità della sostanza chimica in esame nel mezzo disperdente.

PROCEDURA

Numero e sesso degli animali

27. Si raccomanda di costituire gruppi di almeno 10 maschi e 12-13 femmine. Nella fase pre-esposizione si procede alla valutazione della ciclicità estrale nelle femmine e gli animali che non presentano un ciclo tipico di 4-5 giorni non sono inclusi nello studio; si raccomanda pertanto di utilizzare un numero supplementare di femmine per ottenere 10 femmine per ciascun gruppo. Eccetto i casi in cui gli effetti tossici sono notevoli, si dovrebbero ottenere per ciascun gruppo almeno 8 femmine gravide, che generalmente è il numero minimo accettabile. Lo scopo è ottenere un numero di gravidanze e nidiate che consenta una valutazione significativa del potenziale della sostanza chimica in esame di influire negativamente sulla fertilità, sulla gravidanza, sul comportamento materno, sulla suzione, sulla crescita e sullo sviluppo della progenie F_1, dal concepimento al tredicesimo giorno dopo il parto. Qualora si preveda di sacrificare a intervalli intermedi alcuni animali, il numero va aumentato del numero di animali che si prevede di sacrificare prima del completamento dello studio. Si può considerare di includere un gruppo satellite supplementare di cinque animali (5 per sesso) nel gruppo di controllo e nel gruppo trattato con la dose più elevata al fine di monitorare la reversibilità, la persistenza o l'insorgenza ritardata di effetti tossici sistemici, per almeno 14 giorni dopo il trattamento. Gli animali del gruppo satellite non vengono fatti accoppiare e, di conseguenza, non sono utilizzati ai fini della valutazione della tossicità per la riproduzione/lo sviluppo.

Dosaggio

28. Si utilizzano generalmente almeno tre gruppi da trattare e un gruppo di controllo. Per stabilire le dosi da utilizzare, in mancanza di dati adeguati relativi alla tossicità in generale si può effettuare uno studio preliminare di tipo *range finding*. Fatta eccezione per la somministrazione della sostanza chimica in esame, gli animali del gruppo di controllo devono essere trattati in modo identico agli esemplari dei gruppi sottoposti al trattamento. Se si usa un mezzo disperdente per la somministrazione della sostanza chimica in esame, al gruppo di controllo verrà somministrato il medesimo mezzo disperdente nel volume massimo utilizzato.

29. I livelli di dosaggio devono essere selezionati tenendo conto di tutti i dati disponibili sulla tossicità e le caratteristiche (tossico-)cinetiche. Bisogna inoltre tener conto del fatto che potrebbero esserci differenze di sensibilità tra le femmine gravide e quelle non gravide. Il livello massimo di dosaggio deve essere tale da indurre effetti tossici senza cagionare la morte o sofferenze gravi. Sarà inoltre definita una serie decrescente di dosaggi al fine di individuare eventuali risposte a dosi determinate e dimostrare l'assenza di effetti avversi al dosaggio minimo. Per la determinazione dei livelli di dose decrescenti risulta spesso ottimale applicare un fattore di divisione compreso tra due e quattro; è comunque preferibile aggiungere un quarto gruppo di studio piuttosto che avere uno scarto eccessivo (ad esempio superiore a un fattore 10) tra un dosaggio e l'altro.

30. Nel caso di tossicità generale osservata (ad es. riduzione del peso corporeo, effetti a livello epatico, cardiaco, polmonare o renale ecc.) o di altri cambiamenti che potrebbero non essere dovuti ad effetti tossici (ad es. diminuzione dell'assunzione di alimenti, dilatazione del fegato), gli effetti rilevati sugli endpoint endocrini devono essere interpretati con cautela.

Prova limite

31. Qualora uno studio orale, effettuato in conformità con il metodo descritto, con un livello di dosaggio di almeno 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno o, in caso di somministrazione con gli alimenti o l'acqua, ad una concentrazione equivalente (in funzione del peso corporeo), non produca effetti tossici osservabili e se i dati relativi a sostanze di struttura analoga non indicano tossicità, si può ritenere non necessario uno studio completo con diversi dosaggi. La prova limite va effettuata, tranne quando i dati sull'esposizione umana indicano la necessità di utilizzare un livello di dosaggio più elevato. Per altri tipi di somministrazione, ad esempio per inalazione o applicazione cutanea, il livello massimo di esposizione realizzabile dipende in molti casi dalle proprietà fisico-chimiche delle sostanze chimiche da esaminare.

Somministrazione delle dosi

32. Agli animali viene somministrata una dose giornaliera della sostanza chimica in esame sette giorni alla settimana. Se viene effettuata per via intragastrica, la somministrazione deve avvenire in dose singola mediante sonda gastrica o idonea cannula per intubazione. Il volume massimo di liquido che può essere somministrato in una sola volta dipende dalla taglia dell'animale. Il volume non deve superare 1 ml/100 g di peso corporeo, tranne nel caso delle

soluzioni acquose che possono essere somministrate in quantità pari a 2 ml/100 g di peso corporeo. Salvo nel caso di sostanze chimiche irritanti o corrosive, i cui effetti di norma tendono a esacerbarsi con l'aumentare della concentrazione, la variabilità del volume somministrato deve essere ridotta al minimo adeguando la concentrazione, in modo da mantenere un volume costante per tutti i livelli di dosaggio.

33. Per le sostanze chimiche somministrate con la dieta o l'acqua da bere è importante impedire che la quantità della sostanza chimica in esame interferisca con la normale alimentazione o il normale bilancio dei liquidi. Se la sostanza chimica in esame è somministrata con la dieta, si può utilizzare una concentrazione costante nella dieta (ppm) o un livello di dosaggio costante in funzione del peso corporeo di ciascun animale; la scelta di eventuali alternative va specificata. Nel caso di sostanze chimiche somministrate mediante sonda gastrica, la dose va somministrata ogni giorno all'incirca agli stessi orari e regolata almeno settimanalmente per mantenere un livello costante delle dosi rispetto al peso corporeo degli animali. Se lo studio combinato è preliminare a uno studio sulla tossicità a lungo termine o a uno studio effettuato su un'intera generazione, occorre utilizzare una dieta simile in entrambi gli studi.

Protocollo sperimentale

34. La somministrazione della sostanza a entrambi i sessi deve iniziare due settimane prima dell'accoppiamento, dopo un periodo di acclimatazione di almeno cinque giorni e dopo avere osservato nelle femmine un ciclo estrale normale (durante un periodo di pre-trattamento di 2 settimane). Lo studio deve essere programmato in modo tale che la valutazione del ciclo estrale inizi subito dopo il raggiungimento della maturità sessuale completa da parte degli animali. Ciò può variare leggermente a seconda dei ceppi di ratti e dei laboratori, ad esempio 10 settimane per i ratti Sprague Dawley e circa 12 settimane per i ratti Wistar. Le femmine con prole devono essere soppresse il tredicesimo giorno dopo il parto o poco dopo. Per consentire il digiuno notturno delle madri prima del prelievo di sangue (se si preferisce tale opzione), non è necessario sopprimere le madri e la loro progenie lo stesso giorno. Il giorno della nascita (ossia quello in cui viene completato il parto) è il giorno 0 post-parto. Le femmine per le quali non vi sono prove di avvenuta copulazione sono soppresse 24-26 giorni dopo l'ultimo giorno del periodo di accoppiamento. La somministrazione della sostanza va continuata, in entrambi i sessi, durante il periodo di accoppiamento. Dopo tale periodo, la somministrazione deve proseguire per i maschi almeno fino al completamento del periodo di dosaggio totale minimo di 28 giorni. I maschi sono in seguito soppressi o mantenuti in vita e continuano a ricevere la sostanza in esame ai fini di un eventuale secondo accoppiamento, ove ritenuto opportuno.

35. La somministrazione giornaliera delle dosi alle femmine riproduttrici va continuata per tutta la gravidanza e almeno fino al tredicesimo giorno dopo il parto o al giorno prima della soppressione incluso. Per gli studi in cui la sostanza chimica in esame è somministrata tramite inalazione o per via cutanea, la somministrazione deve proseguire almeno fino al diciannovesimo giorno di gestazione incluso e deve essere iniziata di nuovo appena possibile e comunque entro il quarto giorno dalla nascita (PND 4).

36. Gli animali del gruppo satellite destinati al monitoraggio di follow-up, se inclusi, non vengono fatti accoppiare. Essi devono essere esaminati per almeno altri 14 giorni dopo la prima soppressione pianificata delle madri, senza alcun trattamento, al fine di individuare l'insorgenza tardiva, la persistenza o la scomparsa degli effetti tossici.

37. Un diagramma del calendario della prova è contenuto nell'appendice 2.

Cicli estrali

38. I cicli estrali devono essere monitorati prima dell'inizio del trattamento per selezionare per lo studio femmine aventi una ciclicità regolare (cfr. il paragrafo 27). Vanno monitorati anche gli strisci vaginali, ogni giorno dall'inizio del periodo di trattamento finché l'accoppiamento non risulti avvenuto. Se vi è il sospetto che effetti legati a forte stress all'inizio del trattamento possano alterare i cicli estrali, i laboratori possono esporre gli animali utilizzati nella prova per due settimane e quindi effettuare ogni giorno strisci vaginali per monitorare il ciclo estrale per almeno due settimane iniziando nel periodo precedente l'accoppiamento e proseguendo durante il periodo dell'accoppiamento finché quest'ultimo non risulti effettuato. Durante il prelievo delle cellule vaginali/cervicali occorre prestare attenzione a non ledere la mucosa per evitare un'eventuale induzione di pseudogravidanza (8) (9).

Procedura di accoppiamento

39. Nel presente studio si utilizza normalmente il sistema di accoppiamento 1:1 (un maschio per una femmina). Possono essere previste eccezioni in caso di morte occasionale di esemplari maschi. Si deve mettere una femmina con lo stesso maschio fino a quando la copulazione è comprovata o sono trascorse due settimane. Ogni mattina le femmine devono essere esaminate per verificare la presenza di sperma o di tappi vaginali. Il giorno 0 della gravidanza è definito come il giorno in cui si riscontra la prova dell'avvenuta copulazione (presenza di un tappo vaginale o di sperma). Nel caso in cui l'accoppiamento non abbia successo, si può valutare la possibilità di far accoppiare le femmine con maschi di comprovata capacità riproduttiva dello stesso gruppo.

Dimensioni della nidiata

40. Il quarto giorno dopo la nascita è possibile uniformare le dimensioni di ogni nidiata eliminando i piccoli in eccesso tramite selezione casuale, in modo da ottenere, nella misura del possibile, quattro o cinque piccoli per sesso per ciascuna nidiata, a seconda delle dimensioni normali della nidiata nei ceppi di ratti utilizzati. I campioni di sangue devono essere prelevati da due dei piccoli in eccedenza, raggruppati e utilizzati per determinare i livelli sierici di T4. L'eliminazione selettiva dei piccoli, ad esempio in base al peso corporeo o alla distanza anogenitale (AGD), non è opportuna. Ogni volta che il numero di piccoli maschi o femmine non permette di avere quattro o cinque animali di ciascun sesso per nidiata, è accettabile una regolazione parziale (ad esempio, sei maschi e quattro femmine). Se le dimensioni della nidiata scendono al di sotto della soglia di uniformazione (8 o 10 piccoli per ciascuna nidiata), nessun piccolo sarà eliminato. Qualora vi sia un solo piccolo al di sopra della soglia di uniformazione, esso sarà eliminato e utilizzato per prelevare il campione di sangue ai fini della determinazione dei livelli sierici di T4.

41. Se le dimensioni della nidiata non sono uniformate, si sacrificano due piccoli per nidiata il quarto giorno dopo la nascita e si prelevano campioni di sangue per valutare la concentrazione sierica degli ormoni tiroidei. Se possibile, nel selezionare i due piccoli per nidiata da sacrificare, scegliere due femmine per tenere da parte i maschi per la valutazione della retrazione del capezzolo, tranne nel caso in cui l'eliminazione di questi piccoli non lasci alcuna femmina per le valutazioni da effettuare al termine. Non bisogna eliminare alcun piccolo se vi sono meno di 8 o 10 piccoli per nidiata (a seconda delle dimensioni normali della nidiata nei ceppi di ratti utilizzati). Qualora vi sia un solo piccolo in più rispetto alle dimensioni normali della nidiata, un solo piccolo sarà eliminato e utilizzato per prelevare il campione di sangue ai fini della determinazione dei livelli sierici di T4.

Osservazioni

42. Le osservazioni cliniche generali devono essere effettuate almeno una volta al giorno, preferibilmente alla stessa ora e tenendo conto del periodo di massima intensità degli effetti previsti dopo la somministrazione. Vanno registrate le informazioni concernenti le condizioni di salute degli animali. Almeno due volte al giorno, tutti gli animali vengono esaminati al fine di determinare la morbilità e la mortalità.

43. Una volta prima dell'esposizione iniziale (per consentire un confronto sullo stesso soggetto) e, successivamente, almeno una volta alla settimana tutti gli animali genitori vengono sottoposti ad osservazioni cliniche particolareggiate. A tale scopo gli animali vengono tolti dalle gabbie, collocati in un recinto standard ed esaminati di preferenza sempre alla stessa ora, ogni giorno. Occorre registrare con cura le osservazioni, preferibilmente usando sistemi di punteggio statistico definiti appositamente dal laboratorio che esegue la prova. Si avrà cura di ridurre al minimo le variazioni delle condizioni sperimentali; le osservazioni devono essere effettuate da persone che non sono a conoscenza del trattamento somministrato. Si terrà conto, tra l'altro, di tutte le alterazioni della cute, del pelo, degli occhi, delle mucose, della comparsa di secrezioni ed escrezioni e dell'attività neurovegetativa (per esempio lacrimazione, piloerezione, ampiezza pupillare, ritmo respiratorio insolito). Vanno inoltre registrati cambiamenti dell'andatura, della postura e della risposta alla manipolazione, nonché la presenza di movimenti clonici o tonici, stereotipie (ad esempio tolettatura eccessiva, continuo girare in cerchio), parto difficoltoso o prolungato o comportamenti insoliti (ad esempio automutilazione, marcia a ritroso) (10).

44. Ad un certo punto durante lo studio, devono essere svolte valutazioni della reattività sensoriale a stimoli di vario tipo (ad esempio stimoli uditivi, visivi e propriocettivi) (8) (9) (11), della forza di presa (12) e dell'attività motoria (13) per cinque maschi e cinque femmine, selezionati da ciascun gruppo secondo un criterio di casualità. Ulteriori indicazioni sui procedimenti utilizzabili sono contenute nelle voci bibliografiche citate. Tuttavia possono essere applicate anche procedure alternative non indicate nella bibliografia. Nei maschi queste osservazioni funzionali devono essere effettuate verso la fine del periodo di esposizione, poco prima della soppressione programmata ma prima del prelievo dei campioni di sangue per gli esami ematologici o gli esami biochimici clinici (cfr. i paragrafi 53-56, compresa la nota a piè di pagina 1). La prova sulle femmine, che devono trovarsi in uno stato fisiologico simile durante queste prove funzionali, deve essere effettuata di preferenza una sola volta nell'ultima settimana di allattamento (ad esempio, il sesto-tredicesimo giorno di allattamento), poco prima della soppressione programmata. Nella misura del possibile, ridurre i tempi di separazione delle madri e dei piccoli.

45. Le osservazioni funzionali effettuate una volta verso la fine dello studio possono essere evitate nel caso di uno studio preliminare ad un successivo studio subcronico (90 giorni) o ad un successivo studio a lungo termine. In questa eventualità, le osservazioni funzionali devono essere incluse nello studio complementare. D'altro canto, le informazioni ricavate dalle osservazioni funzionali nel corso dello studio a dosi ripetute possono essere utili nella determinazione dei livelli di dosaggio per un successivo studio subcronico o a lungo termine.

46. Eccezionalmente è possibile omettere le osservazioni funzionali per i gruppi che evidenzino comunque segni di tossicità tali da interferire in modo significativo con l'esecuzione degli esami funzionali.

47. La durata della gestazione deve essere registrata e calcolata dal giorno 0 di gravidanza. Ogni nidiata deve essere esaminata non appena possibile dopo il parto per stabilire il numero e il sesso dei piccoli, dei nati morti, dei nati vivi e degli esemplari più piccoli del normale (i piccoli molto più piccoli dei piccoli di controllo) e la presenza di grosse anomalie.

48. Si procede a contare e identificare il sesso dei piccoli vivi e a pesare le nidiate entro 24 ore dal parto (giorno 0 o 1 dopo il parto) e almeno il quarto e il tredicesimo giorno dopo il parto. Oltre a quanto osservato per gli animali genitori (cfr. i paragrafi 43 e 44), deve essere registrato qualsiasi comportamento anomalo della prole.

49. Occorre misurare la distanza anogenitale (AGD) di ogni piccolo nello stesso giorno dalla nascita, tra il PND 0 e il PND 4. Il peso corporeo del piccolo va registrato il giorno in cui ne viene misurata l'AGD, che deve essere normalizzata in funzione della taglia, preferibilmente usando la radice cubica del peso corporeo (14). Va contato il numero di capezzoli/areole nei piccoli di sesso maschile il PND 12 o 13, come raccomandato nella linea guida n. 151 dell'OCSE (15).

Peso corporeo e consumo di cibo/acqua

50. I maschi e le femmine devono essere pesati il primo giorno della somministrazione, in seguito almeno settimanalmente, e al termine della somministrazione. Le femmine devono essere pesate durante la gravidanza i giorni 0, 7, 14 e 20 ed entro 24 ore dal parto (giorno 0 o 1 dopo il parto) e almeno il quarto e il tredicesimo giorno dopo il parto. Queste osservazioni vanno riportate singolarmente per ciascun animale adulto.

51. Durante il periodo precedente l'accoppiamento e durante la gravidanza e l'allattamento, l'assunzione di cibo deve essere misurata almeno una volta alla settimana. La misurazione dell'assunzione di cibo durante l'accoppiamento è facoltativa. Se la sostanza chimica in esame è somministrata con acqua da bere, durante questi periodi va misurata anche l'assunzione di acqua.

Ematologia

52. Una volta durante lo studio devono essere effettuati i seguenti esami ematologici su cinque maschi e cinque femmine, selezionati da ciascun gruppo secondo un criterio di casualità: ematocrito, concentrazioni di emoglobina, conteggio degli eritrociti, reticulociti, conteggio totale e differenziale dei leucociti, numero di placchette e misura del tempo e del potenziale di coagulazione. Se la sostanza in esame o i suoi metaboliti putativi hanno o possono avere proprietà ossidanti occorre effettuare altre analisi, relative tra l'altro alla concentrazione di metaemoglobine o ai corpi di Heinz.

53. I campioni di sangue devono essere prelevati da un determinato sito. Durante il prelievo dei campioni le femmine devono trovarsi in uno stato fisiologico simile. Allo scopo di evitare le difficoltà pratiche connesse alla variabilità all'inizio della gestazione, i prelievi di sangue nelle femmine possono essere effettuati alla fine del periodo precedente l'accoppiamento in alternativa al prelievo dei campioni di sangue al momento della soppressione degli animali o nel periodo immediatamente precedente. Per i maschi, i campioni di sangue devono essere prelevati di preferenza al momento della soppressione degli animali o nel periodo immediatamente precedente. In alternativa, i prelievi di sangue nei maschi possono essere effettuati anche alla fine del periodo precedente l'accoppiamento se per le femmine è stato prescelto questo momento.

54. I campioni devono essere conservati in condizioni adeguate.

Biochimica clinica

55. Le determinazioni biochimiche cliniche per lo studio degli effetti tossici gravi sui tessuti e, specificamente, degli effetti su reni e fegato, vanno condotte su campioni di sangue prelevati dai cinque maschi e dalle cinque femmine di ciascun gruppo selezionati. Si raccomanda di lasciare gli animali a digiuno la notte precedente la raccolta dei campioni ([1]). Le analisi sul plasma o sul siero comprenderanno il sodio, il potassio, il glucosio, il colesterolo totale, l'urea, la creatinina, le proteine totali e l'albumina, almeno due enzimi indicatori degli effetti epatocellulari (come l'alanina aminotransferasi, l'aspartato aminotransferasi e la sorbitol deidrogenasi). Le determinazioni di altri enzimi (di origine epatica o di altro tipo) e della bilirubina possono talvolta fornire indicazioni utili.

56. Vanno prelevati campioni di sangue da un sito specifico in base al seguente programma:

— da almeno due piccoli per nidiata il quarto giorno dopo la nascita, se il numero di piccoli lo consente (cfr. i paragrafi 40-41)

— da tutte le madri e almeno due piccoli di 13 giorni per nidiata al termine dell'esperimento e

— da tutti i maschi adulti, al termine dell'esperimento.

Tutti i campioni di sangue vanno conservati in condizioni adeguate. Si procede alla valutazione della concentrazione sierica per gli ormoni tiroidei (T4) nei campioni di sangue dei piccoli di 13 giorni e degli adulti maschi. Se del caso, si effettua un'ulteriore valutazione dell'ormone T4 nei campioni di sangue delle madri e dei piccoli di 4 giorni. Se opportuno, si possono misurare facoltativamente anche i livelli di altri ormoni. I prelievi di sangue dei piccoli possono essere raggruppati per nidiata ai fini dell'analisi degli ormoni tiroidei. Gli ormoni tiroidei (T4 e TSH) sono misurati di preferenza come «totale».

([1]) Per svariate misurazioni del siero e del plasma, e soprattutto per il glucosio, sarebbe preferibile mantenere il digiuno per tutta la notte. Il motivo principale è che l'aumento della variabilità dovuto inevitabilmente al mancato digiuno tenderebbe a mascherare effetti meno evidenti rendendo più difficile l'interpretazione. Dall'altro lato, però, il digiuno notturno può interferire con il metabolismo generale degli animali (delle femmine gravide), interferisce con l'allattamento e, soprattutto negli studi sull'alimentazione, può incidere sull'esposizione quotidiana alla sostanza chimica in esame. Se si opta per il digiuno notturno, gli esami biochimico-clinici dovranno essere effettuati dopo le osservazioni funzionali della quarta settimana per i maschi. Le madri devono essere mantenute in vita per un altro giorno dopo la rimozione dei piccoli, ad esempio il tredicesimo giorno dopo il parto. Le madri devono essere tenute a digiuno notturno dal tredicesimo o quattordicesimo giorno di allattamento e il sangue prelevato prima della soppressione deve essere utilizzato per i parametri di chimica clinica.

57. A titolo facoltativo, nel corso dell'ultima settimana dello studio si possono effettuare le seguenti analisi delle urine su campioni raccolti in momenti specifici: aspetto, volume, osmolalità o densità relativa, pH, proteine, glucosio e sangue/cellule ematiche.

58. È inoltre necessario considerare la possibilità di condurre studi sui marker sierologici dei danni generici ai tessuti. Altre determinazioni dovranno essere eseguite qualora si abbia motivo di ritenere o di sospettare che le proprietà della sostanza chimica in esame possano alterare i profili metabolici riguardanti il calcio, il fosfato, i trigliceridi a digiuno e la glicemia a digiuno, gli ormoni specifici, la metemoglobina e la colinesterasi. Questi devono essere confermati caso per caso.

59. I fattori seguenti possono influenzare la variabilità e le concentrazioni assolute delle analisi ormonali:

— momento della soppressione, per via della variazione diurna delle concentrazioni ormonali;

— metodi di soppressione, evitando di stressare inutilmente gli animali in quanto ciò potrebbe incidere sulle concentrazioni ormonali;

— kit per le analisi ormonali che possono differire per le loro curve standard.

60. I campioni di plasma destinati specificatamente all'analisi ormonale devono essere prelevati nelle stesse ore della giornata. I valori numerici ottenuti dalle analisi delle concentrazioni ormonali differiscono in funzione dei kit disponibili in commercio utilizzati.

61. Se i dati di riferimento storici sono inadeguati, occorre tenere conto delle variabili ematologiche e di biochimica clinica prima di iniziare i dosaggi, di preferenza su un gruppo di animali diverso dal gruppo in esame. Per le femmine, i dati devono riguardare animali che allattano.

PATOLOGIA

Necroscopia macroscopica

62. Tutti gli animali adulti utilizzati nello studio vanno sottoposti a un'autopsia macroscopica completa e dettagliata che comprenda un attento esame della superficie esterna del corpo, di tutti gli orifizi e delle cavità cranica, toracica e addominale e del loro contenuto. Occorre prestare particolare attenzione agli organi dell'apparato riproduttivo e prendere nota del numero dei siti di impianto. Gli strisci vaginali devono essere esaminati il giorno dell'autopsia per determinare lo stadio del ciclo estrale e consentire di stabilire correlazioni con l'istopatologia degli organi riproduttivi femminili.

63. Testicoli ed epididimi, come pure l'insieme composto dalla prostata e dalle vescicole seminali con le ghiandole della coagulazione, di tutti i maschi adulti vanno opportunamente liberati da eventuali tessuti aderenti e pesati umidi immediatamente dopo la dissezione, per evitare l'essiccamento. Inoltre, si possono pesare facoltativamente altri organi, come l'insieme del muscolo elevatore dell'ano e del muscolo bulbocavernoso, le ghiandole bulbouretrali e il glande nei maschi e le due ovaie (peso a umido) e l'utero (compresa la cervice) nelle femmine; se effettuate, queste misurazioni facoltative devono avvenire subito dopo la dissezione. Le ovaie, i testicoli, gli epididimi, gli organi sessuali accessori e tutti gli organi degli animali adulti che presentano lesioni macroscopiche devono essere conservati.

64. Per tutti i maschi e le femmine adulti e per un piccolo maschio e un piccolo femmina di tredici giorni di ciascuna nidiata, le ghiandole della tiroide devono essere conservate nel mezzo di fissazione più adatto per il successivo esame istopatologico che si intende effettuare. Il peso della tiroide può essere stabilito dopo la fissazione. Anche in questo caso l'ablazione deve essere eseguita con cautela e solo previa fissazione per evitare di danneggiare i tessuti. L'eventuale danneggiamento dei tessuti infatti potrebbe compromettere l'analisi istopatologica. I campioni di sangue devono essere prelevati da un determinato sito immediatamente prima o durante la soppressione degli animali e conservati in condizioni adeguate (cfr. il paragrafo 56).

65. Inoltre, per almeno cinque maschi e femmine adulti, selezionati a caso da ciascun gruppo (tranne quelli trovati moribondi e/o sacrificati prima della conclusione dello studio), fegato, reni, ghiandole surrenali, timo, milza, cervello e cuore vanno opportunamente liberati da eventuali tessuti aderenti e pesati umidi immediatamente dopo la dissezione, per evitare l'essiccamento. I seguenti tessuti vanno conservati nel mezzo di fissazione più adatto, sia per il tipo di tessuto, sia per il successivo esame istopatologico che si intende effettuare: tutte le lesioni macroscopiche, cervello (porzioni rappresentative comprendenti cervello, cervelletto e ponte), midollo spinale, occhi, stomaco, intestino tenue e crasso (comprese le placche di Peyer), fegato, reni, ghiandole surrenali, milza, cuore, timo, trachea e polmoni (conservati con dilatazione mediante fissativo e poi immersione), gonadi (testicoli e ovaie), organi sessuali accessori (utero e collo dell'utero, epididimi, prostata, vescicole seminali con ghiandole della coagulazione), vagina, vescica e linfonodi [oltre al linfonodo più vicino un altro linfonodo, in funzione dell'esperienza del laboratorio (16)], nervo periferico (sciatico o tibiale) preferibilmente in prossimità del muscolo, muscolo e osso dello

scheletro con il midollo osseo (una sezione o un preparato fresco di midollo osseo aspirato). Si raccomanda di fissare i testicoli mediante immersione in un fissativo di Bouin o di Davidson modificato (16) (17) (18); la fissazione in formalina è sconsigliata per questi tessuti. La tunica albuginea può essere perforata, con un ago, con delicatezza e superficialmente in entrambi i poli dell'organo per consentire la rapida penetrazione del fissativo. I risultati clinici e di altro tipo possono evidenziare la necessità di esaminare altri tessuti. Vanno inoltre conservati tutti gli organi considerati organi bersaglio in base alle proprietà note della sostanza in esame.

66. I tessuti elencati qui di seguito possono apportare informazioni utili sugli effetti endocrini: gonadi (ovaie e testicoli), organi sessuali accessori (utero, collo dell'utero, epididimi, vescicole seminali con ghiandole di coagulazione, prostata dorso laterale e ventrale), vagina, ipofisi, ghiandola mammaria maschile e ghiandola surrenale. Non ci sono sufficienti riscontri di alterazioni nelle ghiandole mammarie maschili, ma questo parametro può essere molto sensibile alle sostanze con attività estrogenica. L'osservazione degli organi/tessuti non ripresi nel paragrafo 65 è facoltativa.

67. I piccoli morti o soppressi il tredicesimo giorno dopo il parto, o poco dopo, devono essere sottoposti almeno a un attento esame esterno volto a individuare eventuali anomalie evidenti. Particolare attenzione deve essere dedicata all'apparato riproduttivo esterno, che va esaminato alla ricerca di eventuali alterazioni dello sviluppo.

Esame istopatologico

68. Gli organi e i tessuti conservati di tutti gli animali selezionati del gruppo di controllo e del gruppo trattato con la dose più elevata vanno sottoposti a un esame istopatologico completo (con particolare attenzione alle fasi della spermatogenesi nelle gonadi maschili e dell'istopatologia della struttura delle cellule interstiziali dei testicoli). La ghiandola della tiroide dei piccoli e degli animali adulti restanti può essere esaminata se necessario. Si procede a questi esami anche sugli animali degli altri gruppi se nel gruppo cui viene somministrata la dose più elevata si osservano alterazioni correlate al trattamento. Il documento di orientamento sull'istopatologia (10) fornisce informazioni supplementari sulla dissezione, la fissazione, l'asportazione e l'istopatologia dei tessuti endocrini.

69. Vanno esaminate tutte le lesioni macroscopiche. Allo scopo di contribuire alla determinazione dei NOAEL, devono essere esaminati gli organi bersaglio di altri gruppi-dose, soprattutto dei gruppi che presenterebbero un NOAEL.

70. Quando si utilizza un gruppo satellite l'esame istopatologico va eseguito sui tessuti e sugli organi per i quali sono stati osservati effetti nei gruppi trattati.

DATI E RELAZIONE

Dati

71. Devono essere forniti dati individuali su ciascun animale. Inoltre, tutti i dati vanno riassunti sotto forma di tabella, evidenziando per ciascun gruppo di studio il numero di animali all'inizio della prova, il numero di animali rinvenuti morti durante la prova o sottoposti a eutanasia, il momento di eventuali decessi o soppressioni, il numero di animali fertili, il numero di femmine gravide, il numero di animali che mostrano segni di tossicità, una descrizione dei segni di tossicità osservati, ivi compresi il momento dell'insorgenza, la durata e la gravità degli effetti tossici, i tipi di alterazioni istopatologiche, nonché tutti i dati di rilievo riguardanti le nidiate. Un formato tabulare di relazione sintetica che si è rivelato molto utile per la valutazione degli effetti sulla riproduzione/sullo sviluppo è contenuto nell'appendice 3.

72. Se possibile, i risultati numerici devono essere valutati sulla base di un metodo statistico appropriato e comunemente accettato. Per i confronti degli effetti osservati nell'ambito di un intervallo di dosaggio si deve evitare il ricorso a prove t multiple. I metodi statistici devono essere selezionati durante la fase di progettazione dello studio. L'analisi statistica dell'AGD e della retrazione del capezzolo deve essere basata sui dati individuali dei piccoli, tenendo conto degli effetti sulle nidiate. Se opportuno, utilizzare la nidiata come unità di analisi. L'analisi statistica del peso corporeo dei piccoli deve essere basata sui dati individuali dei piccoli, tenendo conto delle dimensioni della nidiata. Tenuto conto della portata ridotta dello studio, le analisi statistiche sotto forma di prove intese ad accertare la «significatività» dei risultati hanno un valore limitato per molti endpoint, soprattutto quelli riproduttivi. Alcuni dei metodi più ampiamente utilizzati, soprattutto le prove parametriche per la valutazione della tendenza centrale, sono inadeguati. Se si ricorre ad analisi statistiche, il metodo scelto deve essere adatto alla distribuzione della variabile esaminata e selezionato prima dell'inizio dello studio.

Valutazione dei risultati

73. I risultati del presente studio di tossicità vanno valutati in base agli effetti osservati e ai risultati della necroscopia e dell'esame microscopico. La valutazione deve includere il rapporto fra la dose della sostanza chimica in esame e la presenza o l'assenza, l'incidenza e la gravità delle anomalie, comprese eventuali lesioni macroscopiche, gli organi bersaglio identificati, l'infertilità, le anomalie cliniche, la capacità riproduttiva, gli effetti sulla generazione successiva, le alterazioni del peso corporeo, gli effetti sulla mortalità ed eventuali altri effetti tossici.

74. Tenuto conto del breve periodo di trattamento del maschio, l'istopatologia dei testicoli e degli epididimi deve essere considerata insieme ai dati sulla fertilità nel quadro della valutazione degli effetti sulla riproduttività del maschio. Può essere utile anche utilizzare eventuali dati di controllo storici sulla riproduzione/lo sviluppo (ad esempio per le dimensioni della nidiata, l'AGD, la retrazione del capezzolo, i livelli sierici di T4) per facilitare l'interpretazione dello studio.

75. Ai fini del controllo di qualità, si suggerisce di raccogliere dati di controllo storici e di calcolare i coefficienti di variazione per i dati numerici, in particolare per i parametri legati all'individuazione degli interferenti endocrini. Questi dati possono essere utilizzati, a fini di confronto, in fase di valutazione degli studi effettivamente realizzati.

Relazione sull'esecuzione della prova

76. La relazione sull'esecuzione della prova deve comprendere le seguenti informazioni:

Sostanza chimica in esame:

— origine, numero di lotto, data limite per l'uso, se disponibili;

— stabilità della sostanza chimica in esame, se nota;

Sostanza monocostituente:

— aspetto fisico, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche;

— dati di identificazione chimica: denominazioni IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula strutturale, purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc.;

Sostanza multicostituente, UVCB e miscele:

— caratterizzate nella massima misura possibile con l'identità chimica (cfr. sopra), con la presenza quantitativa e con le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti;

Mezzo disperdente (se del caso):

— giustificazione per la scelta del mezzo disperdente utilizzato, se diverso dall'acqua;

Animali utilizzati nella prova:

— specie/ceppo impiegati;

— numero, età e sesso degli animali;

— origine, condizioni di alloggio, dieta, ecc.;

— peso di ciascun animale all'inizio della prova;

— qualora non siano stati utilizzati ratti, spiegazione del motivo;

Condizioni sperimentali:

— criteri di selezione delle dosi;

— informazioni dettagliate sulla formulazione della sostanza chimica in esame/incorporazione nella dieta, sulla concentrazione finale, sulla stabilità e sull'omogeneità del preparato;

— modalità precise di somministrazione della sostanza chimica in esame;

— se del caso, conversione della concentrazione della sostanza nella dieta o nell'acqua (ppm) in dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno);

— dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua;

— descrizione dettagliata del protocollo di randomizzazione utilizzato per selezionare gli eventuali piccoli da sopprimere;

Risultati:

— peso corporeo/cambiamenti del peso corporeo;

— assunzione di cibo ed eventualmente di acqua;

— dati sulla risposta tossica per sesso e per dose, compresa la fertilità, la gestazione ed eventuali altri sintomi di

— tossicità;

— durata della gestazione, effetti tossici o di altro tipo sulla riproduzione, sulla prole, sulla crescita postnatale, ecc.;

— natura, gravità e durata dei segni clinici (sia reversibili che non reversibili);

— valutazione dell'attività sensoriale, della forza prensile e dell'attività motoria;

— esami ematologici con i relativi valori basali;

— esami biochimici clinici con i relativi valori basali;

— numero di femmine adulte con ciclo estrale normale o anomalo e durata del ciclo;

— numero di nati vivi e di perdite post-impianto;

— numero di piccoli con anomalie evidenti; valutazione macroscopica degli organi genitali esterni, numero di esemplari più piccoli del normale;

— momento del decesso durante lo studio o indicazione della sopravvivenza degli animali alla conclusione della prova;

— numero di impianti e dimensioni e peso della nidiata al momento della registrazione;

— dati relativi al peso corporeo dei piccoli;

— AGD di tutti i piccoli (e peso corporeo il giorno della misurazione dell'AGD);

— retrazione del capezzolo nei piccoli di sesso maschile;

— livelli di ormoni tiroidei, piccoli di 13 giorni e maschi adulti (e madri e piccoli di 4 giorni se sottoposti a misurazione);

— peso corporeo al momento della soppressione e dati sul peso degli organi negli animali genitori;

— risultati della necroscopia;

— descrizione dettagliata dei risultati istopatologici;

— dati sull'assorbimento (se disponibili);

— elaborazione statistica dei risultati, se del caso.

Discussione dei risultati

Conclusioni

Interpretazione dei risultati

77. Lo studio fornirà valutazioni della tossicità per la riproduzione/lo sviluppo associata alla somministrazione di dosi ripetute. In particolare, poiché lo studio verte sia sulla tossicità generale sia sugli endpoint di tossicità per la riproduzione/lo sviluppo, i risultati consentiranno di distinguere gli effetti sulla riproduzione o sullo sviluppo che si osservano in assenza di tossicità generale da quelli espressi solo a livelli che risultano tossici anche per gli animali genitori (cfr. i paragrafi 7-11). Esso può fornire indicazioni sulla necessità di condurre ulteriori indagini e orientamenti in merito alla progettazione di studi successivi. Si consulti il documento di orientamento n. 43 dell'OCSE per indicazioni sull'interpretazione dei risultati in merito alla riproduzione e allo sviluppo (19). Il documento di orientamento dell'OCSE n. 106 sulla valutazione istologica delle prove endocrine e sulla riproduzione nei roditori (16) fornisce informazioni sulla preparazione e la valutazione degli organi (endocrini) e degli strisci vaginali che possono essere utili per il presente metodo di prova.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Disponibile su richiesta presso l'Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico (OCSE), Parigi.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Disponibile su richiesta presso l'Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico (OCSE), Parigi.

(3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. and Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). J. *Toxicol*, Sci., 19, 141-149.

(4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. and Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. Fundam. Appl. *Toxicol*., 18, 89-95.

(5) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M.and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.

(9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (Eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (No 60).

(11) Moser V.C., McDaniel K.M. and Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol.* Appl. *Pharmacol.*, 108, 267-283.

(12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. and Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. *Toxicol.*, 1, 233-236.

(13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599-609.

(14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds. (1999). «Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights», Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(15) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) OECD (2009).Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 106) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(17) Hess RA and Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(18) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30, 524-533.

(19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Appendice 1

DEFINIZIONI (CFR. ANCHE LA LINEA GUIDA N. 150 DELL'OCSE (20))

Androgenicità la capacità di una sostanza chimica di agire come un ormone androgenico naturale (ad es. il testosterone) in un mammifero.

Antiandrogenicità la capacità di una sostanza chimica di inibire l'attività di un ormone androgenico naturale (ad es. il testosterone) in un mammifero.

Antiestrogenicità la capacità di una sostanza chimica di inibire l'attività di un ormone estrogenico naturale (ad es. l'estradiolo 17ß) in un mammifero.

Attività antitiroidea la capacità di una sostanza chimica di inibire l'attività di un ormone tiroideo naturale (ad es. T_3) in un mammifero.

Sostanza chimica una sostanza o una miscela.

Tossicità per lo sviluppo la manifestazione della tossicità per la riproduzione, che risulta in disturbi prenatali, perinatali, postnatali, strutturali o funzionali nella progenie.

Dose quantità di sostanza chimica somministrata. La dose è espressa col peso della sostanza chimica in esame per unità di peso corporeo dell'animale utilizzato nella prova per giorno (mg/kg peso corporeo/giorno) o come una concentrazione costante nella dieta.

Dosaggio termine generale che ricomprende la dose, la frequenza e la durata della somministrazione.

Tossicità evidente termine generale che designa i segnali evidenti di tossicità a seguito della somministrazione di una sostanza chimica. Questi segni devono essere sufficienti per consentire la valutazione dei pericoli ed essere tali che si possa prevedere che l'aumento della dose somministrata comporti la comparsa di segni di tossicità grave e probabilmente la mortalità.

Compromissione della fertilità i disturbi delle funzioni o della capacità riproduttive maschili o femminili.

Tossicità materna gli effetti nocivi sulle femmine gravide, che si verificano in modo specifico (effetto diretto) o non specifico (effetto indiretto) e correlati allo stato di gravidanza.

NOAEL l'abbreviazione di n*o-observed-adverse-effect level*, ossia la dose più elevata alla quale non si osservano effetti avversi legati al trattamento.

Estrogenicità la capacità di una sostanza chimica di agire come un ormone estrogenico naturale (ad es. l'estradiolo 17ß) in un mammifero.

Tossicità della riproduzione gli effetti nocivi sulla progenie e/o la compromissione delle funzioni o della capacità riproduttive maschili e femminili.

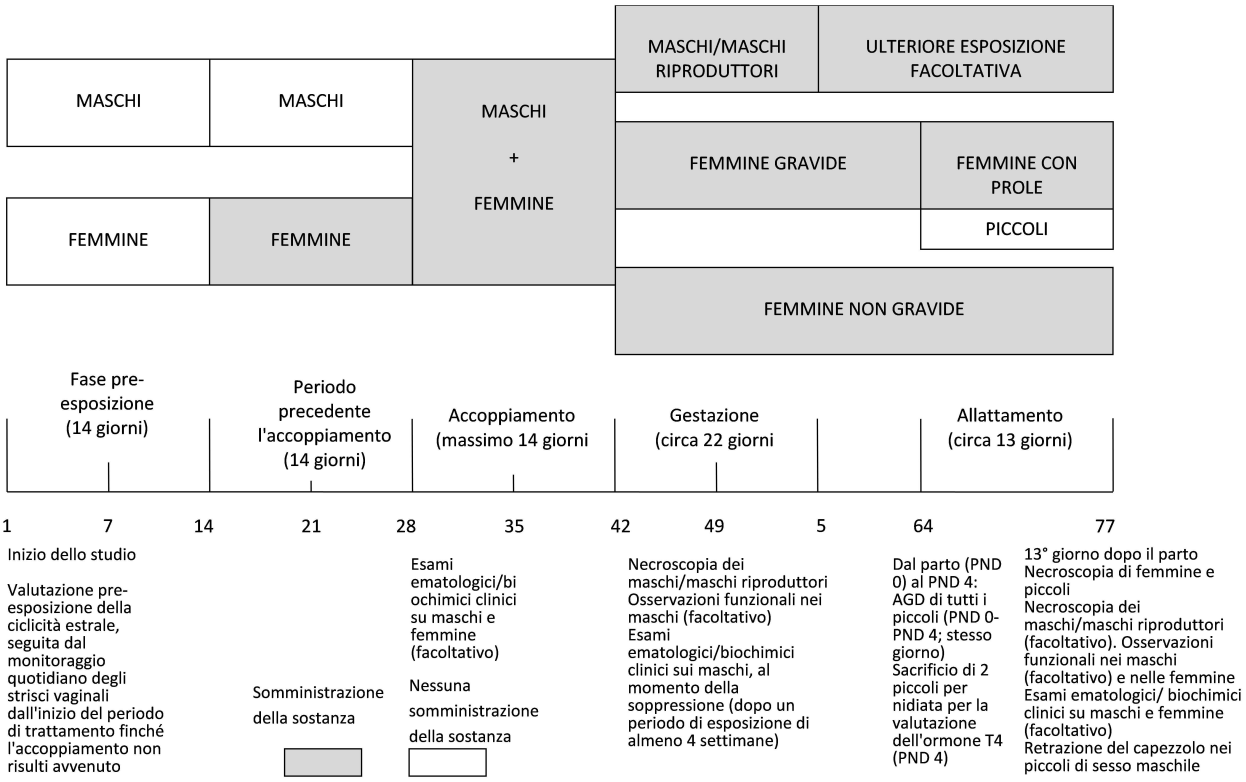
Sostanza chimica in esame qualsiasi sostanza o miscela saggiata seguendo il presente metodo di prova.

Attività tiroidea la capacità di una sostanza chimica di agire come un ormone tiroideo naturale (ad es. T_3) in un mammifero.

Validazione processo scientifico destinato a caratterizzare i requisiti e i limiti operativi di un metodo di prova e a dimostrarne l'affidabilità e la pertinenza per un fine specifico.

Appendice 2

DIAGRAMMA DEL PROTOCOLLO SPERIMENTALE INDICANTE LA DURATA MASSIMA DELLO STUDIO, BASATO SU UN PERIODO DI ACCOPPIAMENTO COMPLETO DI 14 GIORNI



Appendice 3

RELAZIONE SINTETICA IN FORMATO TABULARE DEGLI EFFETTI SULLA RIPRODUZIONE/SULLO SVILUPPO

OSSERVAZIONI	VALORI				
Dosaggio (unità)…….	0 (controllo)	…	…	…	…
Coppie formate (N)					
Ciclo estrale (almeno durata media e frequenza dei cicli irregolari)					
Femmine per le quali la copulazione risulta avvenuta (N)					
Femmine gravide (N)					
Giorni di concepimento 1 - 5 (N)					
Giorni di concepimento 6 -…[1] (1) (N)					
Gravidanza≤21 giorni (N)					
Gravidanza = 22 giorni (N)					
Gravidanza ≥ 23 giorni (N)					
Madri che hanno partorito piccoli vivi (N)					
Madri con piccoli vivi il quarto giorno dopo il parto (N)					
Impianti/madre (media)					
Piccoli vivi/madre alla nascita (media)					
Piccoli vivi/madre al quarto giorno (media)					
Rapporto numerico tra i sessi (m/f) alla nascita (media)					
Rapporto numerico tra i sessi (m/f) al quarto giorno (media)					
Peso della nidiata alla nascita (media)					
Peso della nidiata al quarto giorno (media)					
Peso dei piccoli alla nascita (media)					
Peso dei piccoli al momento della misurazione dell'AGD (media maschi, media femmine)					
AGD dei piccoli misurata lo stesso giorno dalla nascita, tra la nascita e il giorno 4 (media maschi, media femmine, prendere nota del PND)					

OSSERVAZIONI	VALORI				
Peso dei piccoli al quarto giorno (media)					
Peso dei piccoli al tredicesimo giorno (media)					
Retrazione del capezzolo dei piccoli maschi al tredicesimo giorno (media)					
PICCOLI CON ANOMALIE					
Madri con 0					
Madri con 1					
Madri con ≥ 2					
PERDITA DELLA PROGENIE					
Perdite prenatali (impianti meno piccoli nati vivi)					
Femmine con 0					
Femmine con 1					
Femmine con 2					
Femmine con ≥ 3					
Perdite postnatali (piccoli nati vivi meno piccoli vivi il tredicesimo giorno dopo il parto)					
Femmine con 0					
Femmine con 1					
Femmine con 2					
Femmine con ≥ 3					

([1]) Ultimo giorno del periodo di accoppiamento

B.65 **METODO DI PROVA *IN VITRO* CON MEMBRANA IMPERMEABILE PER LA CORROSIONE CUTANEA**

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida OCSE. n. 435 (2015) Per corrosione cutanea si intende la produzione di lesioni irreversibili della pelle sotto forma di necrosi visibili nell'epidermide e nel derma, a seguito dell'applicazione di una sostanza chimica in esame, secondo la definizione del Sistema globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (sistema GHS dell'ONU) (1) e del regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele (in appresso «regolamento CLP» ([1])). Il presente metodo, equivalente alla linea guida aggiornata n. 435 dell'OCSE, costituisce un metodo di prova *in vitro* su membrana impermeabile che può essere utilizzato per individuare le sostanze chimiche corrosive. Il presente metodo di prova prevede l'utilizzo di una membrana artificiale destinata a reagire alle sostanze chimiche corrosive in modo analogo alla cute degli animali *in situ*.

2. La corrosività cutanea è generalmente valutata applicando la sostanza chimica in esame sulla pelle di animali vivi e determinando l'ampiezza della lesione dei tessuti dopo un determinato lasso di tempo (2). Oltre al presente metodo di prova, per individuare le sostanze chimiche corrosive sono stati adottati alcuni metodi di prova *in vitro* come alternativa (3) (4) al metodo standard *in vivo* sui conigli (Capitolo B.4 del presente allegato, equivalente alla linea guida n. 404 dell'OCSE). La strategia di prova e valutazione su più livelli del sistema GHS dell'ONU per la stima e la classificazione della corrosività cutanea e le linee guida dell'OCSE sugli approcci integrati di prova e valutazione (*Integrated Approaches to Testing and Assessment* - IATA) per l'irritazione e la corrosione cutanea autorizzano l'utilizzo di procedure di prova *in vitro* validate e accettate di cui ai moduli 3 e 4 (1)(5). Le linee guida IATA descrivono diversi moduli che raggruppano le fonti di informazione e gli strumenti di analisi e i) forniscono orientamenti su come integrare e utilizzare i dati sperimentali e altri tipi di dati per valutare il potenziale di irritazione e di corrosione cutanea delle sostanze chimiche in esame e ii) propongono un approccio quando sono necessarie prove aggiuntive, anche quando si ottengono risultati negativi (5). Nell'ambito di questo approccio modulare, i risultati positivi dei metodi di prova *in vitro* possono essere utilizzati per classificare una sostanza chimica nella categoria «corrosivo» senza dover effettuare prove sugli animali, riducendo ed ottimizzando dunque l'utilizzo degli animali e evitando dolore e stress agli stessi.

3. Sono stati realizzati studi di validazione del modello *in vitro* della membrana impermeabile reperibile in commercio sotto il nome Corrositex® (6)(7)(8), che hanno evidenziato una precisione del 79 % per quanto riguarda la previsione della corrosività cutanea (128/163), una sensibilità dell'85 % (76/89) e una specificità del 70 % (52/74) per una base di dati di 163 sostanze chimiche e miscele (7). Sulla base della sua validità riconosciuta, l'utilizzo di questo metodo di riferimento validato (*validated reference method* - VRM) è stato raccomandato nell'ambito di una strategia sperimentale su più livelli per valutare il rischio potenziale di corrosione cutanea generato dalle sostanze chimiche (5)(7). Prima di poter utilizzare a fini regolamentari un modello *in vitro* di membrana impermeabile per valutare la corrosione cutanea, occorre determinarne l'affidabilità, la pertinenza (accuratezza) e i limiti per l'uso proposto al fine di garantire che sia equivalente al VRM (9), conformemente agli standard di prestazione predefiniti (10). L'applicazione del sistema dell'OCSE di reciproca accettazione dei dati sarà garantito solo una volta che i metodi di prova proposti, nuovi o aggiornati e conformi agli standard di prestazione, sono stati esaminati e integrati nella corrispondente linea guida dell'OCSE. Attualmente la linea guida n. 435 dell'OCSE e il presente metodo di prova coprono un solo un metodo *in vitro*: il modello Corrositex® disponibile in commercio.

4. Altri metodi per le prove sulla corrosività cutanea si basano sull'utilizzo di pelle umana ricostituita (linea guida n. 431 dell'OCSE) (3) e di pelle di ratto ricostituita (linea guida n. 430 dell'OCSE) (4). Il presente metodo di prova consente inoltre la sottocategorizzazione delle sostanze chimiche corrosive nelle tre sottocategorie di corrosività nell'ambito del sistema UN GHS e nei tre gruppi di imballaggio ONU per i trasporti per quanto concerne il rischio di corrosività. La presente linea guida è stata inizialmente adottata nel 2006 e aggiornata nel 2015 per tenere conto del documento di orientamento IATA e aggiornare l'elenco delle sostanze chimiche per la verifica della competenza tecnica.

DEFINIZIONI

5. Le definizioni utilizzate sono riportate nell'appendice.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

6. La prova descritta nel presente metodo di prova consente di individuare le sostanze e le miscele chimiche corrosive e di classificarle in sottocategorie di sostanze corrosive conformemente al sistema GHS dell'ONU/ CLP (tabella 1). Questo metodo di prova può essere utilizzato anche per decidere in merito alla corrosività e alla non corrosività di classi specifiche di sostanze chimiche, ad esempio, gli acidi organici e minerali, i derivati acidi ([2]) e le basi in alcune prove di trasporto (7)(11)(12). Il presente metodo di prova descrive un protocollo generico simile ad un metodo di prova di riferimento validato (7). Il presente metodo di prova non fornisce informazioni adeguate sull'irritazione

([1]) Regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2008, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006 (GU L 353 del 31.12.2008, pag. 1).

([2]) «Derivato acido» è una designazione di classe non specifica ed è definito in termini generali come una sostanza chimica prodotta a partire da un acido sia direttamente sia mediante modifica o parziale sostituzione. Questa classe comprende anidridi, acidi alogenati, sali e altri tipo di sostanze chimiche.

cutanea, ma è opportuno notare che il metodo di prova B.46 (equivalente alla linea guida n. 439 dell'OCSE) riguarda in modo specifico l'irritazione cutanea *in vitro* e gli effetti sulla salute (13). Per una valutazione completa degli effetti cutanei locali dopo una singola esposizione della pelle, si raccomanda di consultare il documento di orientamento dell'OCSE relativo agli approcci integrati in materia di prove e valutazioni (IATA) (5).

Tabella 1

La categoria e le sottocategorie di corrosività cutanea del sistema GHS dell'ONU ([1])

Categoria di corrosività (categoria 1) (per le autorità che non utilizzano sottocategorie)	Possibili sottocategorie di corrosività ([1]) (per le autorità che utilizzano sottocategorie, ivi compreso il regolamento CLP)	Corrosivo per ≥ 1 animale su 3	
		Esposizione	Osservazioni
Corrosivo	Sottocategoria di corrosione 1A	≤ 3 minuti	≤ 1 ora
	Sottocategoria di corrosione 1B	> 3 minuti / ≤ 1 ora	≤ 14 giorni
	Sottocategoria di corrosione 1C	> 1 ora / ≤ 4 ore	≤ 14 giorni

([1]) Per l'UE, il regolamento CLP applica le tre sottocategorie di corrosione della pelle 1A, 1B e 1C.

7. Un limite del metodo di riferimento validato (7) consiste nel fatto che, in base agli esiti del test di compatibilità iniziale, questo metodo non potrà essere applicato a numerose sostanze chimiche non corrosive e alcune sostanze chimiche corrosive (cfr. il paragrafo 13). Le sostanze acquose aventi un pH compreso tra 4,5 e 8,5 spesso non sono adattate alla prova; tuttavia, l'85 % delle sostanze chimiche testate in questa gamma di valori del pH è risultato non corrosivo per i test sugli animali (7). Il metodo *in vitro* della membrana impermeabile può essere utilizzato per testare solidi (solubili o insolubili in acqua), liquidi (acquosi o non acquosi) ed emulsioni. Tuttavia, le sostanze chimiche in esame che non causano un cambiamento rilevabile nella prova di compatibilità, ad esempio, un cambiamento di colore nel sistema di rilevamento chimico (*Chemical Detection System* - CDS) del metodo di prova di riferimento validato, non possono essere sottoposte a prova con il metodo della membrana impermeabile, rendendo necessario il ricorso ad altri metodi di prova.

PRINCIPIO DELLA PROVA

8. Il sistema di prova si compone di due elementi: una biobarriera macromolecolare sintetica e un sistema di rilevamento chimico (CDS); in questo metodo di prova il CDS rileva i danni provocati dalle sostanze chimiche in esame corrosive sulla membrana impermeabile dopo l'applicazione della sostanza chimica in esame sulla superficie della membrana impermeabile macromolecolare sintetica (7), danni che probabilmente sono dovuti a uno o più dei meccanismi di corrosione simili a quelli che agiscono sulla pelle viva.

9. Si può misurare la penetrazione della membrana impermeabile (o la sua permeazione) mediante una serie di procedure o CDS, in particolare un cambiamento di colore di un colorante indicatore di pH o di qualsiasi altra proprietà della soluzione di indicatore situata sotto la barriera.

10. Occorre stabilire l'idoneità della membrana impermeabile, ossia la sua pertinenza e affidabilità, per l'uso previsto. Occorre quindi assicurarsi che le varie preparazioni garantiscano le proprietà di impermeabilità, ossia che siano in grado di mantenere una barriera contro le sostanze chimiche non corrosive, e siano atte a classificare le proprietà corrosive delle sostanze chimiche in varie sottocategorie di corrosività nell'ambito del sistema GHS dell'ONU (1). La classificazione assegnata si basa sul tempo impiegato dalla sostanza chimica per penetrare attraverso la membrana impermeabile fino alla soluzione di indicatore.

DIMOSTRAZIONE DELLA COMPETENZA DI LABORATORIO

11. Prima di utilizzare sistematicamente il metodo della barriera impermeabile *in vitro*, i laboratori sono tenuti a dimostrare la loro competenza tecnica classificando correttamente le dodici sostanze di riferimento raccomandate nella tabella 2. Qualora una sostanza elencata non sia disponibile o nel caso in cui sia giustificato, può essere utilizzata un'altra sostanza per la quale sono disponibili dati di riferimento *in vivo* e *in vitro* (ad esempio scegliendo dalla lista delle sostanze chimiche di riferimento (10)), a condizione che siano applicati i medesimi criteri di selezione di cui alla tabella 1.

Tabella 2

Sostanze chimiche per la verifica della competenza tecnica [1]

Sostanza [2]	Numero di registrazione CAS)	Classe chimica	Sottocategoria GHS ONU *in vivo* [3]	Sottocategoria GHS ONU *in vitro* [3]
Trifluoruro di boro diidrato	13319-75-0	Acidi inorganici	1A	1A
Acido nitrico	7697-37-2	Acidi inorganici	1A	1A
Pentacloruro di fosforo	10026-13-8	Precursori di acidi inorganici	1A	1A
Cloruro di valerile	638-29-9	Cloruri di acidi	1B	1B
Idrossido di sodio	1310-73-2	Basi inorganiche	1B	1B
1-(2-Amminoetil) piperazina	140-31-8	Ammine alifatiche	1B	1B
Cloruro di benzensolfonile	98-09-9	Cloruri di acidi	1C	1C
N,N-dimetil benzilammina	103-83-3	Aniline	1C	1C
Tetraetilene pentammina	112-57-2	Ammine alifatiche	1C	1C
Eugenolo	97-53-0	Fenoli	NC	NC
Acrilato di nonile	2664-55-3	Acrilati/metacrilati	NC	NC
Bicarbonato di sodio	144-55-8	Sali inorganici	NC	NC

(1) Le dodici sostanze sopra elencate comprendono tre sostanze provenienti da ciascuna delle tre sottocategorie del sistema GHS dell'ONU per le sostanze corrosive e tre sostanze non corrosive e sono facilmente reperibili in commercio; la determinazione della sottocategoria GHS dell'ONU si basa sui risultati di prove *in vivo* di elevata qualità. Queste sostanze sono ricavate dall'elenco di 40 sostanze di riferimento che figurano nell'elenco minimo delle sostanze chimiche identificate per dimostrare l'accuratezza e l'affidabilità dei metodi di prova strutturalmente e funzionalmente simili al metodo di prova di riferimento validato, e sono state selezionate tra le 163 sostanze chimiche di riferimento originariamente utilizzate per validare il metodo di prova di riferimento (Corrositex®) (7) (10) (14). L'obiettivo di questa procedura di selezione era includere, nella misura del possibile, sostanze chimiche che: fossero rappresentative della gamma delle reazioni di corrosività (ad esempio, sostanze non corrosive; gruppi di imballaggio I, II e III delle Nazioni Unite) che il metodo di prova di riferimento validato è in grado di misurare o prevedere; fossero rappresentative delle classi chimiche usate nel processo di validazione; avessero strutture chimiche ben definite; consentissero di ottenere risultati definitivi con il metodo di prova di riferimento validato *in vivo*; consentissero di ottenere risultati definitivi con il metodo di prova di riferimento *in vivo*; fossero disponibili in commercio; e non comportassero costi di smaltimento proibitivi (14).
(2) Sostanze analizzate non diluite o con una purezza del 90 %
(3) I gruppi di imballaggio delle Nazioni Unite I, II e III corrispondono, rispettivamente, alle sottocategorie 1A, 1B e 1C del sistema GHS delle Nazioni Unite. NC; non corrosivo.

PROCEDURA

12. I paragrafi successivi contengono la descrizione dei componenti e delle procedure di un metodo di prova con membrana impermeabile artificiale per la valutazione della corrosività (7) (15) sulla base dell'attuale VRM, ossia il metodo commercialmente disponibile Corrositex®. La membrana impermeabile e le soluzioni di compatibilità e di indicatore nonché le soluzioni che consentono la categorizzazione possono essere prodotte, preparate o acquistate sul mercato, come nel caso del VRM Corrositex®. È disponibile un protocollo del metodo di prova su campione del metodo di prova di riferimento validato (7). Le prove devono essere effettuate a temperatura ambiente (17-25 °C) e i componenti devono soddisfare le condizioni indicate qui di seguito.

Prova di compatibilità della sostanza chimica in esame

13. Prima di eseguire la prova con la membrana impermeabile, si effettua una prova di compatibilità per determinare se la sostanza in esame è rilevabile dal CDS. Se il CDS non rileva la sostanza chimica in esame, il metodo di prova con la membrana impermeabile non è adatto per valutare la potenziale corrosività di questa particolare sostanza chimica e deve essere utilizzato un metodo di prova diverso. Il CDS e le condizioni di esposizione utilizzati per la prova di compatibilità devono riprodurre l'esposizione subita nella successiva prova con la membrana impermeabile.

Prova di categoria di scala temporale della sostanza chimica in esame

14. Se il metodo di prova lo consente, una sostanza chimica che è risultata idonea alla prova di compatibilità può essere oggetto di una prova di categoria di scala temporale, ossia uno screening che consente di distinguere tra acidi o basi deboli e forti. Ad esempio, nel metodo di prova di riferimento validato viene utilizzata una prova di classificazione di scala temporale per stabilire quale delle due scale temporali dovrebbe essere utilizzata a seconda che venga rilevata una riserva acida o una riserva alcalina significativa. Per determinare la corrosività e la sottocategoria GHS dell'ONU per la corrosività cutanea, si dovrebbero usare due diversi tempi di permeazione, in base alla riserva acida o alcalina della sostanza chimica in esame.

COMPONENTI DEL METODO DI PROVA DELLA MEMBRANA IMPERMEABILE

Membrana impermeabile

15. La membrana impermeabile è costituita da due elementi: un gel acquoso macromolecolare proteico e una membrana di supporto permeabile. Il gel proteico dovrebbe essere impermeabile ai liquidi e ai solidi, ma può essere corroso e permeabilizzato. È opportuno conservare la membrana impermeabile pronta all'uso in condizioni prestabilite al fine di evitare il deterioramento del gel, ad esempio per via dell'essiccazione, di una crescita microbica, dello spostamento degli strati, dello screpolamento, che inficerebbero le sue prestazioni. Verrà stabilito un periodo di conservazione accettabile e le preparazioni di membrane impermeabili non saranno utilizzate dopo lo scadere di tale periodo.

16. La membrana di supporto permeabile garantisce un supporto meccanico al gel proteico durante il processo di gelificazione e l'esposizione alla sostanza chimica in esame. La membrana di supporto dovrebbe impedire il cedimento e lo spostamento del gel ed essere facilmente permeabile a tutte le sostanze chimiche in esame.

17. Il gel proteico costituito da proteine (ad esempio cheratina, collagene, o miscele di proteine, che formano una matrice di gel) funge da obiettivo per la sostanza chimica in esame. Il materiale proteico è posto sulla superficie della membrana di sostegno e, dopo la sua gelificazione, si colloca la membrana impermeabile sulla soluzione di indicatore. Il gel proteico dovrebbe essere di pari spessore e densità nel corso dell'intero processo, privo di bolle d'aria o difetti che potrebbero comprometterne l'integrità funzionale.

Sistema di rilevamento chimico (CDS)

18. La soluzione d'indicatore, che è la stessa soluzione utilizzata per la prova di compatibilità, dovrebbe reagire alla presenza di una sostanza chimica in esame. Si può impiegare un colorante o una combinazione di coloranti indicatori di pH, ad esempio il rosso cresolo o il metilarancio, che cambia colore in presenza della sostanza chimica in esame. Il sistema di misurazione può essere visivo o elettronico.

19. È opportuno valutare la pertinenza e l'affidabilità dei sistemi di rilevamento messi a punto per individuare il passaggio della sostanza chimica in esame attraverso la membrana impermeabile al fine di definire la gamma di sostanze chimiche che possono essere rilevate e i limiti quantitativi di rilevamento.

ESECUZIONE DELLA PROVA

Assemblaggio dei componenti del metodo di prova

20. La membrana impermeabile è posta in una fiala (o tubo) contenente la soluzione d'indicatore in modo che la membrana di appoggio sia interamente a contatto con la soluzione d'indicatore e non si formino bolle d'aria. Occorre accertarsi che l'integrità della membrana sia preservata.

Applicazione della sostanza chimica in esame

21. Una quantità adeguata della sostanza chimica in esame, ad esempio 500 µl di un liquido o 500 mg di un solido finemente polverizzato (7), viene accuratamente depositata sulla superficie superiore della membrana impermeabile e ripartita in modo uniforme. Per ciascuna sostanza chimica in esame e i controlli corrispondenti viene preparato un numero di repliche adeguato, ad esempio quattro (7) (cfr. i paragrafi da 23 a 25). Si prende nota dell'ora in cui viene applicata la sostanza chimica in esame alla membrana impermeabile. Per garantire la registrazione accurata dei periodi brevi di corrosione, le applicazioni della sostanza chimica in esame nelle fiale sono scaglionate.

Misurazione delle penetrazioni nella membrana impermeabile

22. Ogni fiala è sottoposta a un monitoraggio adeguato, viene registrato il momento del primo cambiamento della soluzione d'indicatore, vale a dire la penetrazione della barriera, e viene determinato il tempo trascorso tra l'applicazione e la penetrazione della membrana impermeabile.

Controlli

23. Nelle prove che prevedono l'utilizzo di un mezzo disperdente o di un solvente con la sostanza chimica di prova, questi devono essere compatibili con il sistema della membrana impermeabile, ossia non devono intaccare l'integrità di tale sistema né modificare la corrosività della sostanza chimica in esame. Se del caso, il controllo con solvente (o con il mezzo disperdente) dovrebbe essere testato in concomitanza per dimostrare la compatibilità del solvente con il sistema della barriera impermeabile.

24. È opportuno inoltre testare contemporaneamente alla sostanza chimica di prova una sostanza chimica di controllo (corrosiva) la cui attività di corrosione è di grado medio, ad esempio 110 ± 15 mg di idrossido di sodio (sottocategoria di corrosività 1B del sistema GHS dell'ONU) (7) al fine di valutare se le prestazioni del sistema sono accettabili. Potrebbe essere utile includere un secondo controllo positivo della stessa classe chimica della sostanza chimica in esame per valutare il potenziale di corrosività relativo di una sostanza chimica in esame corrosiva. Occorre selezionare controlli positivi di media corrosività (sottocategoria 1B del sistema GHS dell'ONU) al fine di individuare i cambiamenti del tempo di penetrazione eventualmente troppo lunghi o troppo brevi rispetto al valore di riferimento stabilito, e che evidenziano pertanto un malfunzionamento del sistema di prova. A tal fine, le sostanze chimiche estremamente corrosive (sottocategoria 1A del sistema GHS dell'ONU) o non corrosive sono di utilità limitata. Una sostanza chimica corrosiva della sottocategoria 1B del sistema GHS dell'ONU consentirebbe di rilevare una durata di permeazione troppo breve o troppo lunga. Una sostanza chimica poco corrosiva (sottocategoria 1C del sistema GHS dell'ONU) potrebbe essere utilizzata come controllo positivo per misurare la capacità del metodo di prova di distinguere sistematicamente le sostanze chimiche poco corrosive da quelle non corrosive. A prescindere dall'approccio utilizzato, occorre stabilire un intervallo accettabile di risposta dei controlli positivi sulla base dell'intervallo storico delle durate di permeazione del o dei controlli positivi utilizzati, ad esempio la media di ± 2-3 deviazioni standard. In ogni studio, è opportuno stabilire il tempo di permeazione esatto del controllo positivo in modo da poter individuare le deviazioni che si situano al di fuori dell'intervallo accettabile.

25. Contemporaneamente alla sostanza chimica in esame occorre testare anche un controllo negativo (non corrosivo), ad esempio acido citrico al 10 % e acido propionico al 6 % (7), per ottenere una misura di controllo di qualità supplementare a dimostrazione dell'integrità funzionale della membrana impermeabile.

Criteri di accettabilità dello studio

26. Secondo i parametri di tempo stabiliti per ciascuna sottocategoria di corrosività (del sistema GHS delle Nazioni Unite), il tempo (in minuti) trascorso tra l'applicazione di una sostanza chimica in esame sulla membrana impermeabile e la penetrazione della membrana è utilizzata per prevedere la corrosività della sostanza chimica in esame. Affinché uno studio sia considerato accettabile, il controllo positivo concomitante dovrebbe dare il tempo di risposta di penetrazione previsto (ad esempio 8-16 minuti di tempo permeazione per l'idrossido di sodio se utilizzato come controllo positivo), il controllo negativo concomitante non dovrebbe essere corrosivo e il corrispondente controllo con solvente (se presente) non dovrebbe essere corrosivo né alterare il potenziale di corrosività della sostanza chimica in esame. Prima di utilizzare sistematicamente un metodo conforme al presente metodo di prova, i laboratori sono tenuti a dimostrare la loro competenza tecnica avvalendosi delle 12 sostanze raccomandate nella tabella 2. Per i nuovi metodi «strutturalmente analoghi» sviluppati nell'ambito di questo metodo di prova che sono strutturalmente e funzionalmente simili al metodo di riferimento validato (14), dovrebbero essere utilizzati gli standard di prestazione predefiniti per dimostrare l'affidabilità e l'accuratezza del nuovo metodo prima del suo utilizzo per le prove a fini regolamentari (10).

Interpretazione dei risultati e classificazione di corrosività della sostanza chimica in esame

27. Il tempo (in minuti) trascorso tra l'applicazione della sostanza chimica in esame alla membrana impermeabile e la penetrazione della membrana è utilizzato per classificare la sostanza chimica in esame secondo le sottocategorie GHS dell'ONUI (1) e, se del caso, secondo i gruppi di imballaggio delle Nazioni Unite (16). I valori di tempo limite di ciascuna delle tre sottocategorie di corrosività sono definiti per ciascun metodo di prova proposto. Le decisioni finali sui tempi limite dovrebbero tenere conto dell'esigenza di minimizzare la sottoclassificazione del pericolo di corrosione (ad esempio, falsi negativi). Nella presente linea guida è opportuno utilizzare i tempi limite del metodo Corrositex® descritti nella tabella 3, in quanto si tratta dell'unico metodo di prova che ad oggi rispetta gli orientamenti della linea guida (7).

Tabella 3

Modello predittivo Corrositex®

Tempo medio di permeazione (min.)		Predizione UN GHS ([3])
Sostanza chimica in esame di categoria 1 ([1]) (determinata dalla prova di categorizzazione del metodo)	Sostanza chimica in esame di categoria 2 ([2]) (determinata dalla prova di categorizzazione del metodo)	
0-3 min.	0-3 min.	Corrosivo Sottocategoria 1A facoltativa
> 3 a 60 min.	> 3 a 30 min.	Corrosivo Sottocategoria 1B facoltativa
> 60 a 240 min.	> 30 a 60 min.	Corrosivo Sottocategoria 1C facoltativa
> 240 min.	> 60 min.	Sostanza chimica non corrosiva

([1]) Sostanze chimiche in esame con rapporto acido/alcalino elevato (6).
([2]) Sostanze chimiche in esame con rapporto acido/alcalino ridotto (6).
([3]) Le sottocategorie UN GHS 1A, 1B e 1C corrispondono ai gruppi di imballaggio I, II e III rispettivamente.

DATI E RELAZIONE

Dati

28. Il tempo (in minuti) trascorso tra l'applicazione della sostanza in esame e la penetrazione della barriera per la sostanza in esame e il o i controlli positivi devono essere riportati sotto forma di tabelle contenenti i risultati di ciascuna replica e come media ± di deviazione standard per ciascuna prova.

Relazione sull'esecuzione della prova

29. La relazione sull'esecuzione della prova deve comprendere le seguenti informazioni.

Sostanze chimiche in esame e sostanze di controllo:

— sostanza monocostituente: identificazione chimica, come denominazioni IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula strutturale, purezza, identità chimica delle impurezze se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc.;

— sostanza multicostituente, UVCB o miscela: caratterizzata, nella misura del possibile, attraverso l'identità chimica (cfr. sopra), le proporzioni quantitative e le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti;

— aspetto fisico, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche pertinenti;

— origine, numero del lotto se disponibile;

— trattamento della sostanze chimica in esame/sostanza di controllo prima della prova, se applicabile (ad esempio, riscaldamento, frantumazione);

— stabilità della sostanza chimica in esame, data limite di utilizzo, data della nuova analisi, se nota;

— condizioni di conservazione.

Mezzo disperdente:

— identificazione, concentrazione (ove pertinente), volume utilizzato;

— motivazione della scelta del mezzo.

Modello della barriera impermeabile in vitro e protocollo utilizzati, ivi compresa la precisione e affidabilità dimostrate

Condizioni sperimentali:

— descrizione dell'apparecchiatura e delle procedure di preparazione utilizzate;

— fonte e composizione della membrana impermeabile *in vitro* utilizzata;

— composizione e proprietà della soluzione d'indicatore;

— metodo di rilevamento;

— quantità della sostanza chimica in esame e delle sostanze di controllo;

— numero di repliche;

— descrizione e giustificazione del test di categorizzazione della scala temporale;

— metodo di applicazione;

— tempi di osservazione.

— descrizione dei criteri di valutazione e classificazione impiegati;

— dimostrazione della competenza nell'esecuzione del metodo di prova prima del suo uso sistematico testando le sostanze chimiche per la verifica della competenza tecnica.

Risultati:

— presentazione sotto forma di tabella dei dati grezzi individuali ottenuti da ciascun campione di prova e di controllo per ogni replica;

— descrizioni di altri effetti osservati;

— classificazione ottenuta con riferimento al modello predittivo/ai criteri decisionali utilizzati.

Discussione dei risultati

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth Revised Edition, UN New York and Genev, 2013. Disponibile qui: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Capitolo B.4 del presente allegato: Irritazione/corrosione cutanea acuta.

(3) Capitolo B.40 *bis* del presente allegato, Corrosione cutanea *in vitro*: test su un modello di epidermide umana ricostituita (RHE)

(4) Capitolo B.40 del presente allegato, Corrosione cutanea *in vitro*: Resistenza elettrica transcutanea (TER).

(5) OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economici (OCSE)

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, 483-524.

(7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495.)

(8) Gordon V.C., Harvell J.D. and Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37-45.

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment (N. 34).

(10) OECD (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economici (OCSE) Disponibile qui: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf.

(11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. ATLA 29, 96-97.

(12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (20 settembre 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) Capitolo B.46 del presente allegato, Irritazione cutanea *in vitro*: metodo di prova su un modello di epidermide umana ricostituita. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Disponibile qui: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Disponibile qui: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) United Nations (UN) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Disponibile qui: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Appendice

DEFINIZIONI

Accuratezza: grado di concordanza tra i risultati ottenuti con il metodo di prova e i valori di riferimento accettati. Misura l'efficienza del metodo di prova e costituisce un aspetto della pertinenza. Il termine è spesso utilizzato come sinonimo di "concordanza" per indicare la percentuale di risultati corretti di un metodo di prova (9).

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Sistema di rilevamento chimico (CDS): sistema di misurazione visivo o elettronico che si avvale di una soluzione di indicatore che reagisce alla presenza di una sostanza chimica in esame (ad esempio con la modifica di un colorante indicatore di pH o di una combinazione di questi coloranti) che registra un cambiamento di colore in risposta alla presenza della sostanza in esame o evidenzia altri tipi di reazioni chimiche o elettrochimiche.

Concordanza: misura dell'efficacia del metodo di prova per i metodi che forniscono un risultato ordinabile in categorie; si tratta di un aspetto della pertinenza. Il termine è usato a volte come sinonimo di "accuratezza" ed è definito come la proporzione di tutte le sostanze chimiche in esame che sono correttamente classificate come positive o negative. La concordanza dipende strettamente dalla prevalenza di risultati positivi in tutti i tipi di sostanze chimiche in esame (9).

Sistema globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (GHS dell'ONU): sistema di classificazione delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) secondo tipi standardizzati e livelli di rischio fisico, sanitario e ambientale, che elabora i relativi elementi di comunicazione, quali pittogrammi, avvertenze, indicazioni di pericolo, consigli di precauzioni e schede informative di sicurezza, per trasmettere informazioni sugli effetti avversi di dette sostanze a tutela delle persone (compresi datori di lavoro, lavoratori, trasportatori, consumatori e personale di pronto intervento) e dell'ambiente (1).

IATA: Approcci integrati in materia di prove e valutazioni (*Integrated Approaches to Testing and Assessment*).

Miscela: una miscela o una soluzione composta di due o più sostanze.

Sostanza monocostituente: sostanza, definita attraverso la sua composizione quantitativa, in cui un costituente principale è presente in percentuale pari ad almeno l'80 % (p/p).

Sostanza multicostituente: sostanza, definita attraverso la sua composizione quantitativa, in cui più costituenti principali sono presenti in concentrazione ≥ 10 % (p/p) e < 80 % (p/p). Una sostanza multicostituente è il risultato di un processo di fabbricazione. La differenza tra miscela e sostanza multicostituente è che una miscela è ottenuta attraverso la miscelazione di due o più sostanze senza che avvenga una reazione chimica. Una sostanza multicostituente è il risultato di una reazione chimica.

NC: Non corrosivo.

Standard di prestazione: standard, basati su un metodo di riferimento validato, che consentono di valutare la comparabilità di un metodo proposto che è simile sotto il profilo meccanicistico e funzionale. Detti standard comprendono: i) gli elementi essenziali del metodo di prova; ii) un elenco minimo di sostanze chimiche di riferimento scelte tra le sostanze utilizzate per dimostrare le prestazioni accettabili del metodo di prova validato; e iii) in funzione dei risultati ottenuti con il metodo di riferimento validato, i livelli comparabili di affidabilità e accuratezza che il metodo proposto dovrebbe ottenere quando viene valutato utilizzando l'elenco minimo di sostanze di riferimento (9).

Pertinenza: descrizione del rapporto tra la prova e l'effetto studiato; indica se la prova è significativa e utile per uno scopo specifico. È il grado con cui la prova misura o prevede correttamente l'effetto biologico di interesse. La pertinenza comprende una valutazione dell'accuratezza (concordanza) di una prova (9).

Affidabilità: misura in cui l'esecuzione di un metodo di prova può essere riprodotta nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi seguendo il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità intra-laboratorio e inter-laboratori (9).

Sensibilità: proporzione di tutte le sostanze chimiche positive/attive correttamente classificate dal metodo di prova. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di un metodo di prova (9).

Corrosione cutanea *in vivo*: il manifestarsi di lesioni irreversibili della pelle, vale a dire, necrosi visibile dell'epidermide e del derma, a seguito dell'applicazione della sostanza chimica di prova per non più di quattro ore. Gli effetti tipici della corrosione sono ulcere, sanguinamento, croste sanguinolente e, al termine di un periodo di osservazione di 14 giorni, depigmentazione cutanea dovuta all'effetto sbiancante, chiazze di alopecia e cicatrici. Per valutare le lesioni dubbie potrebbe essere necessario ricorrere a un esame istopatologico.

Specificità: proporzione di tutte le sostanze chimiche negative/inattive correttamente classificate dal metodo di prova. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di un metodo di prova (9).

Sostanza: un elemento chimico e i suoi composti, allo stato naturale od ottenuti per mezzo di un procedimento di fabbricazione, compresi gli additivi necessari a mantenerne la stabilità e le impurezze derivanti dal procedimento utilizzato, ma esclusi i solventi che possono essere separati senza compromettere la stabilità della sostanza o modificarne la composizione.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata applicando il presente metodo di prova.

UVCB: sostanze di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali biologici.

B.66 SAGGI DI TRANSATTIVAZIONE *IN VITRO* TRAMITE TRASFEZIONE STABILE PER L'INDIVIDUAZIONE DI SOSTANZE AGONISTE E ANTAGONISTE DEI RECETTORI ESTROGENICI

INTRODUZIONE GENERALE

Linea guida dell'OCSE per i metodi di prova basata su standard di prestazione

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida n. 455 (2016) dell'OCSE. La linea guida n. 455 è basata su standard di performance (PBTG) che descrive la metodologia della transattivazione *in vitro* tramite trasfezione stabile per l'individuazione delle sostanze agoniste e antagoniste dei recettori estrogenici. Comprende una serie di metodi di prova strutturalmente e funzionalmente simili per l'individuazione degli agonisti e degli antagonisti dei recettori estrogenici (ERα e/o ERβ) e dovrebbe agevolare lo sviluppo di nuovi metodi di prova simili o modificati, conformemente ai principi di validazione stabiliti nel documento di orientamento dell'OCSE intitolato «*OECD Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*» (1). I seguenti metodi di prova di riferimento pienamente validati (appendice 2 e appendice 3) costituiscono la base per la presente linea guida:

   — il metodo di TA tramite trasfezione stabile (STTA) (2) che utilizza la linea cellulare (h) ERα-HeLa-9903; e

   — il metodo di VM7Luc ER TA (3) che utilizza la linea cellulare VM7Lu4E2 ([1]), che esprime prevalentemente hERα e, parzialmente, hERββ(4)(5).

   Sono disponibili standard di prestazione (6) (7) per facilitare l'elaborazione e la validazione di metodi di prova simili finalizzati al medesimo endpoint di sicurezza e per consentire di aggiornare tempestivamente la PBTG 455 integrandola con nuovi protocolli simili. Ciò può avvenire, tuttavia, solo dopo che l'OCSE abbia esaminato e approvato tali nuovi protocolli, dichiarando che rispettano gli standard di prestazione. Qualsiasi metodo di prova incluso nella linea guida TG 455 può essere scelto e applicato ai fini della conformità con i requisiti nazionali in materia di prove di transattivazione dei recettori estrogenici (ER TA) nel quadro del sistema dell'OCSE di reciproca accettazione dei dati.

Contesto e principi relativi ai metodi di prova inclusi nella presente linea guida

2. Nel 1998 l'OCSE ha avviato lavori a carattere altamente prioritario destinati a rivedere le linee guida esistenti e a elaborarne di nuove per lo screening e la sperimentazione relativi alle sostanze chimiche ritenute potenziali interferenti endocrini. Nel 2012 è stato rivisto il quadro concettuale dell'OCSE per la sperimentazione e la valutazione delle sostanze chimiche potenzialmente capaci di alterare il sistema endocrino. Le versioni originali e riviste del presente quadro concettuale figurano come allegati nel documento di orientamento dell'OCSE sulle linee guida standardizzate per le prove di valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino (8). Il quadro concettuale comprende cinque livelli, ciascuno dei quali corrisponde a un diverso livello di complessità biologica. Le prove di ER TA descritte nella presente line guida corrispondono al livello 2, che comprende «*saggi in vitro che forniscono dati su determinati meccanismi/vie di attivazione endocrina*». La presente linea guida concerne i metodi di prova *in vitro* di transattivazione (TA) intesi a individuare gli agonisti e gli antagonisti dei recettori estrogenici.

3. L'interazione degli estrogeni con gli ER può influenzare la trascrizione dei geni regolati dagli estrogeni, il che può portare all'induzione o all'inibizione di processi cellulari, compresi i meccanismi necessari alla proliferazione cellulare, allo sviluppo fetale normale e alla funzione riproduttiva (9) (10) (11). La perturbazione dei sistemi estrogenici normali può potenzialmente indurre effetti nocivi sul normale sviluppo (ontogenesi), sulla salute riproduttiva e sull'integrità del sistema riproduttivo.

4. I metodi di prova TA *in vitro* sono basati sull'interazione diretta o indiretta tra le sostanze e uno specifico recettore che regola la trascrizione del prodotto di un gene reporter. Essi sono stati ampiamente utilizzati per valutare l'espressione genica regolata da recettori nucleari specifici, quali gli ER (12) (13) (14) (15) (16). Sono stati proposti per individuare l transattivazione estrogenica regolata da ER (17) (18) (19). Esistono almeno due principali sottotipi di ER nucleari - designati α e β - che sono codificati da geni distinti. Le proteine corrispondenti presentano funzioni biologiche differenti, così come diverse distribuzioni tessutali e affinità di legame con i ligandi (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). Gli ERα nucleari sono i mediatori della risposta estrogenica classica (27) (28) (29) (30); pertanto la maggior parte dei modelli attualmente in fase di sviluppo per misurare l'attivazione o l'inibizione degli ER sono specifici per l'ERα. I metodi di prova servono ad individuare le sostanze chimiche che attivano (o inibiscono) gli ER mediante legame del ligando con il recettore; il complesso recettore-ligando si lega successivamente a specifici elementi di

([1]) Prima del giugno 2016 questa linea cellulare era nominata BG1Luc. Le cellule BG-1 sono state originariamente descritte da *Geisinger et al.* (1998) (35) e ulteriormente caratterizzate dai ricercatori del *National Institute of Environmental Health Sciences* (NIEHS) (36). Relativamente di recente è emerso che esistono due diverse varianti delle cellule BG-1 utilizzate dai ricercatori: BG-1 Fr e BG-1 NIEHS. Un'analisi approfondita, che includeva test sul DNA, di queste due varianti di linee cellulari BG-1, effettuata da Li *et al.* (2014) (37), ha dimostrato che BG-1 Fr era unica e che BG-1 NIEHS, ossia la linea cellulare originaria utilizzata per sviluppare la prova, non era la linea cellulare BG1 del carcinoma ovarico di origine umana, bensì una variante della linea cellulare MCF7 del cancro al seno di origine umana. La linea cellulare utilizzata nel metodo di prova, inizialmente indicata come BG1Lu4E2 (38), sarà ora designata VM7Lu4E2 («V» = variante; «M7» = cellule MCF7). Analogamente, la prova verrà ora designata VM7Luc ER TA. Sebbene cambi l'origine della linea cellulare su cui si basa la prova, ciò non pregiudica gli studi di validazione pubblicati né l'utilità e l'applicazione della presente prova a fini di screening delle sostanze chimiche estrogeniche/anti-estrogeniche.

risposta del DNA e transattiva un gene reporter, inducendo l'aumento dell'espressione cellulare di un marcatore proteico. Questi metodi di prova si basano su diverse risposte dei geni reporter. Nei sistemi basati sulla luciferasi, l'enzima luciferasi trasforma il suo substrato - la luciferina - in un prodotto bioluminescenti che può essere misurato quantitativamente con un luminometro. Tra gli altri esempi di marcatori/reporter comuni figurano la proteina fluorescente e il gene *LacZ* che codifica la β-galattosidasi, un enzima che può trasformare il substrato incolore X-gal (5-bromo-4-cloro-indolil-galattopiranoside) in un prodotto blu che può essere quantificato mediante spettrofotometro. Tali marcatori possono essere valutati in modo rapido e poco costoso grazie ai kit di analisi disponibili in commercio.

5. Gli studi di validazione dei metodi di STTA e VM7Luc TA hanno dimostrato la loro pertinenza e affidabilità per i fini previsti (3)(4)(5)(30). Gli standard di prestazione per i metodi di ER TA basati sulla luminescenza che utilizzano linee cellulari di ghiandole mammarie sono riportati nella relazione dell'ICCVAM sulla valutazione del metodo di prova LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): *An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals* (3). Questi standard di prestazione sono stati modificati per renderli applicabili sia al metodo di STTA sia al metodo VM7Luc TA (2).

6. Le definizioni e le abbreviazioni utilizzate nel presente metodo di prova figurano nell'appendice 1.

Portata e limiti dei metodi di prova di transattivazione

7. I presenti metodi di prova sono proposti a fini di screening e di definizione delle priorità, ma possono fornire anche informazioni sui meccanismi d'azione che possono rivelarsi utili nel quadro di un approccio basato sulla forza probante dei dati. Si basano sulla transattivazione (TA) indotta dall'instaurazione di un legame chimico con gli ER in un sistema *in vitro*. Pertanto non è opportuno che i risultati ottenuti siano direttamente estrapolati e trasposti ai complessi meccanismi di segnalazione e regolazione che caratterizzano un sistema endocrino intatto *in vivo*.

8. La TA mediata dagli ER è considerato uno dei meccanismi chiave di perturbazione endocrina, benché esistano altri meccanismi che possono indurre il medesimo effetto, tra i quali: i) le interazioni con altri recettori e sistemi enzimatici del sistema endocrino; ii) la sintesi ormonale; iii) l'attivazione e/o l'inattivazione metabolica degli ormoni; iv) la distribuzione ormonale nei tessuti bersaglio; e v) l'eliminazione degli ormoni dall'organismo. Nessuno dei metodi di prova oggetto della presente PBTG si basa sulle descritte modalità di azione.

9. Il presente metodo di prova concerne la capacità delle sostanze chimiche di attivare (attività agonista) e anche di inibire (attività antagonista) la trascrizione regolata dagli ER. Alcune sostanze chimiche possono, a seconda del tipo cellulare utilizzato, presentare attività sia agonista sia antagonista, e sono note come «modulatori selettivi dei recettori estrogenici» (SERM). Si potrebbero considerare di sottoporre le sostanze chimiche che danno una risposta negativa con questi metodi di prova a prove di legame agli ER prima di concludere che tali sostanze in esame non si legano al recettore. Inoltre, il metodo di prova fornisce solo un indicatore probabile dell'attività della molecola madre, tenendo conto delle capacità metaboliche limitate dei sistemi cellulari *in vitro*. Considerando che la validazione ha avuto per oggetto solo sostanze singole, non esiste alcuna informazione circa l'applicabilità della prova alle miscele. Ad ogni modo, il metodo di prova è in ogni caso teoricamente applicabile alle prove sulle sostanze multicostituente, sulle UVCB e sulle miscele. Prima di applicare il presente metodo di prova a una sostanza multicostituente, un UVCB o una miscela per generare dati ai fini regolamentari previsti, si deve considerare se, e in caso affermativo, perché, esso possa fornire risultati adeguati a tale scopo. Tali considerazioni non sono necessarie laddove esista una disposizione normativa che obblighi a sottoporre a prova la miscela.

10. A fini di informazione, la tabella 1 fornisce i risultati delle prove agoniste delle 34 sostanze testate con entrambi i metodi di prova di riferimento pienamente validati descritti nel presente metodo di prova. Di queste sostanze, 26 sono definitivamente classificate come agoniste degli ER e 8 come negativi in base a relazioni pubblicate, comprese le prove *in vitro* di legame agli ER e di TA e/o le prove uterotrofiche (2)(3)(18)(31)(32)(33)(34). La tabella 2 fornisce i risultati delle prove antagoniste delle 15 sostanze testate con entrambi i metodi di prova di riferimento pienamente validati descritti nel presente metodo di prova. Di queste sostanze, 4 sono definitivamente/presumibilmente classificate come antagoniste degli ER e 10 come negative in base alle relazioni pubblicate, comprese le prove *in vitro* di legame agli ER e di TA (2)(3)(18)(31). Con riferimento ai dati sintetizzati nelle tabelle 1 e 2, i due metodi di prova di riferimento sono giunti ad una conclusione identica circa la classificazione di tutte le sostanze, tranne una (Mifepristone) per la prova antagonista, e ciascuna sostanza è stata correttamente classificata come agonista/antagonista degli ER o come negativa. Ulteriori informazioni su questo gruppo di sostanze chimiche così come sulle sostanze aggiuntive testate nei metodi di STTA e VM7Luc ER TA nel quadro degli studi di validazione sono fornite negli standard di prestazione per la prova di ER TA (6)(7), appendice 2 (tabelle 1, 2 e 3).

Tabella 1

Quadro d'insieme dei risultati dei metodi di prova di STTA e VM7Luc ER TA ottenuti per le sostanze testate in base ai due metodi agonisti e classificate come agoniste degli ER (Pos) o negative (Neg)

	Sostanza	N. CAS	Metodo di STTA (1)			Metodo VM7Luc ER TA (2)		Fonte dei dati per la classificazione (4)		
			Attività di ER TA	PC_{10} (M)	PC_{50} (b) (M)	Attività di ER TA	EC_{50} (b), (3) (M)	Altri metodi di prova di ER TA (c)	Prove di legame agli ER	Prove uterotrofiche
1	17ß-estradiolo (a)	50-28-2	Pos.	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	Pos.	$5{,}63 \times 10^{-12}$	Pos. (227/227)	Pos.	Pos.
2	17α-estradiolo (a)	57-91-0	Pos.	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	Pos.	$1{,}40 \times 10^{-9}$	Pos. (11/11)	Pos.	Pos.
3	17α-etinilestradiolo (a)	57-63-6	Pos.	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	Pos.	$7{,}31 \times 10^{-12}$	Pos. (22/22)	Pos.	Pos.
4	17β-trenbolone	10161-33-8	Pos.	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	Pos.	$4{,}20 \times 10^{-8}$	Pos. (2/2)	NT	NT
5	19-nortestosterone (a)	434-22-0	Pos.	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	Pos.	$1{,}80 \times 10^{-6}$	Pos. (4/4)	Pos.	Pos.
6	4-cumilfenolo (a)	599-64-4	Pos.	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	Pos.	$3{,}20 \times 10^{-7}$	Pos. (5/5)	Pos.	NT
7	4-*terz*-ottilfenolo (a)	140-66-9	Pos.	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	Pos.	$3{,}19 \times 10^{-8}$	Pos. (21/24)	Pos.	Pos.
8	Apigenin (a)	520-36-5	Pos.	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	Pos.	$1{,}60 \times 10^{-6}$	Pos. (26/26)	Pos.	NT

	Sostanza	N. CAS	Metodo di STTA [1]			Metodo VM7Luc ER TA [2]		Fonte dei dati per la classificazione [4]		
			Attività di ER TA	PC_{10} (M)	PC_{50} [b] (M)	Attività di ER TA	EC_{50} [b], [3] (M)	Altri metodi di prova di ER TA [c]	Prove di legame agli ER	Prove uterotrofiche
9	Atrazin [a]	1912-24-9	Neg.	—	—	Neg.	—	Neg. (30/30)	Neg.	NT
10	Bisfenolo A [a]	80-05-7	Pos.	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	Pos.	$5{,}33 \times 10^{-7}$	Pos. (65/65)	Pos.	Pos.
11	Bisfenolo B [a]	77-40-7	Pos.	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	Pos.	$1{,}95 \times 10^{-7}$	Pos. (6/6)	Pos.	Pos.
12	Ftalato di butilbenzile [a]	85-68-7	Pos.	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	Pos.	$1{,}98 \times 10^{-6}$	Pos. (12/14)	Pos.	Neg.
13	Corticosterone [a]	50-22-6	Neg.	—	—	Neg.	—	Neg. (6/6)	Neg.	NT
14	Cumestrolo [a]	479-13-0	Pos.	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	Pos.	$1{,}32 \times 10^{-7}$	Pos. (30/30)	Pos.	NT
15	Daidzein [a]	486-66-8	Pos.	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	Pos.	$7{,}95 \times 10^{-7}$	Pos. (39/39)	Pos.	Pos.
16	Dietilstilbestrolo [a]	56-53-1	Pos.	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	Pos.	$3{,}34 \times 10^{-11}$	Pos. (42/42)	Pos.	NT
17	Di-n-butilftalato	84-74-2	Pos.	$4{,}09 \times 10^{-6}$		Pos.	$4{,}09 \times 10^{-6}$	Pos. (6/11)	Pos.	Neg.
18	Etilparabene	120-47-8	Pos.	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(no PC_{50})	Pos.	$2{,}48 \times 10^{-5}$	Pos.		NT
19	Estrone [a]	53-16-7	Pos.	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	Pos.	$2{,}34 \times 10^{-10}$	Pos. (26/28)	Pos.	Pos.
20	Genistein [a]	446-72-0	Pos.	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	Pos.	$2{,}71 \times 10^{-7}$	Pos. (100/102)	Pos.	Pos.

	Sostanza	N. CAS	Metodo di STTA [1]			Metodo VM7Luc ER TA [2]		Fonte dei dati per la classificazione [4]		
			Attività di ER TA	PC_{10} (M)	PC_{50} [b] (M)	Attività di ER TA	EC_{50} [b], [3] (M)	Altri metodi di prova di ER TA [c]	Prove di legame agli ER	Prove uterotrofiche
21	Aloperidolo	52-86-8	Neg.	—	—	Neg.	—	Neg. (2/2)	Neg.	NT
22	Kaempferol [a]	520-18-3	Pos.	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	Pos.	$3{,}99 \times 10^{-6}$	Pos. (23/23)	Pos.	NT
23	Kepone [a]	143-50-0	Pos.	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	Pos.	$4{,}91 \times 10^{-7}$	Pos. (14/18)	Pos.	NT
24	Chetoconazolo	65277-42-1	Neg.	—	—	Neg.	—	Neg. (2/2)	Neg.	NT
25	Linuron [a]	330-55-2	Neg.	—	—	Neg.	—	Neg. (8/8)	Neg.	NT
26	*meso*-esestrolo [a]	84-16-2	Pos.	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	Pos.	$1{,}65 \times 10^{-11}$	Pos. (4/4)	Pos.	NT
27	Metiltestosterone [a]	58-18-4	Pos.	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	Pos.	$2{,}68 \times 10^{-6}$	Pos. (5/6)	Pos.	NT
28	Morin	480-16-0	Pos.	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	Pos.	$2{,}37 \times 10^{-6}$	Pos. (2/2)	Pos.	NT
29	Noretinodrel [a]	68-23-5	Pos.	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	Pos.	$9{,}39 \times 10^{-10}$	Pos. (5/5)	Pos.	NT
30	*p,p'*-metossicolor [a]	72-43-5	Pos.	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(no PC_{50}) [b]	Pos.	$1{,}92 \times 10^{-6}$	Pos. (24/27)	Pos.	Pos.
31	Fenobarbital [a]	57-30-7	Neg.	—	—	Neg.	—	Neg. (2/2)	Neg.	NT

	Sostanza	N. CAS	Metodo di STTA [1]			Metodo VM7Luc ER TA [2]		Fonte dei dati per la classificazione [4]		
			Attività di ER TA	PC_{10} (M)	PC_{50} [b] (M)	Attività di ER TA	EC_{50} [b], [3] (M)	Altri metodi di prova di ER TA [c]	Prove di legame agli ER	Prove uterotrofiche
32	Reserpina	50-55-5	Neg.	—	—	Neg.	—	Neg. (4/4)	Neg.	NT
33	Spironolattone [a]	52-01-7	Neg.	—	—	Neg.	—	Neg. (4/4)	Neg.	NT
34	Testosterone	58-22-0	Pos.	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	Pos.	$1{,}75 \times 10^{-5}$	Pos. (5/10)	Pos.	NT

Abbreviazioni: N CAS = numero di registrazione CAS (*Chemical Abstracts Service Registry Number*). M = molare; EC_{50} = concentrazione efficace della sostanza in esame che induce una risposta pari alla metà della risposta massima; Neg.= negativo; Pos.= positivo; NT = non testato; PC_{10} (e PC_{50}) = concentrazione della sostanza in esame per la quale la risposta è pari al 10 % (o 50 % per il valore PC_{50}) dell'attività massima indotta dal controllo positivo (E2, 1 nm) in ciascuna piastra.

[a] Sostanze comuni testate nei saggi di STTA e VM7Luc ER TA e classificate come agoniste degli ER o negative e utilizzate per valutare l'accuratezza nello studio di validazione del VM7Luc ER TA (ICCVAM VM7Luc ER TA Evaluation Report, tabella 4-1 (3)).

[b] La concentrazione massima testata in assenza di limitazioni dovute alla citotossicità o all'insolubilità era, rispettivamente, di 1×10^{-5} M (STTA) e 1×10^{-3} M (VM7Luc ER TA).

[c] Le cifre fra parentesi indicano il numero di risultati classificati come positivi (Pos) o negativi (Neg) rispetto al numero totale di studi di riferimento.

[1] I valori riportati nel documento *Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line* (2).

[2] ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3)

[3] I valori medi di EC_{50} sono stati calcolati a partire dai valori riportati dai laboratori coinvolti nello studio di valutazione del metodo VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM, e Hiyoshi) (3).

[4] Le sostanze sono classificate come agoniste degli ER o negative in base alle informazioni riportate nei Background Review Documents (BRD) dell'ICCVAM relativi alle prove di legame agli ER e di TA ER (31), nonché ai dati ottenuti da pubblicazioni pubblicate ed esaminate dopo il completamento dei BRD dell'ICCVAM (2) (3) (18) (31) (33) (34).
Note: I metodi di prova della presente linea guida non utilizzano tutti gli stessi parametri di misurazione. In alcuni casi, la EC_{50} non può essere calcolata perché non può essere generata una curva di dose-risposta completa. Il valore PC_{10} è un parametro di misurazione fondamentale nel saggio di STTA, ma potrebbero esservi altri esempi in cui una PC_x fornisce informazioni utili.

Tabella 2

Confronto dei risultati dei metodi di prova di STTA e VM7Luc ER TA ottenuti per le sostanze testate in base ai due metodi antagonisti e classificate come antagoniste degli ER (Pos.) o negative (Neg)

	Sostanza ([a])	N. CAS	Metodi di ER STTA ([1])		Metodo VM7Luc ER TA ([2])		Risposte attese ER STTA ([4])	Consenso di classificazione ICCVAM ([5])	Classe chimica nel sistema MeSH ([6])	Classe di prodotto ([7])
			Attività di ER TA	IC_{50} ([b]) (M)	Attività di ER TA	IC_{50} ([b]), ([3]) (M)				
1	4-idrossitamoxifen	68047-06-3	Pos.	$3{,}97 \times 10^{-9}$	Pos.	$2{,}08 \times 10^{-7}$	Pos. moderato	Pos.	Idrocarburo (ciclico)	Prodotto farmaceutico
2	Dibenzo[a.h]antracene	53-70-3	Pos.	No IC_{50}	Pos.	No IC_{50}	Pos.	PP	Composto policiclico	Prodotto chimico di laboratorio, prodotto naturale
3	Mifepristone	84371-65-3	Pos.	$5{,}61 \times 10^{-6}$	Neg.	—	lievemente Pos.	Neg.	Steroide	Prodotto farmaceutico
4	Raloxifene HCl	82640-04-8	Pos.	$7{,}86 \times 10^{-10}$	Pos.	$1{,}19 \times 10^{-9}$	Pos. moderato	Pos.	Idrocarburo (ciclico)	Prodotto farmaceutico
5	Tamoxifene	10540-29-1	Pos.	$4{,}91 \times 10^{-7}$	Pos.	$8{,}17 \times 10^{-7}$	Pos.	Pos.	Idrocarburo (ciclico)	Prodotto farmaceutico
6	17β-estradiolo	50-28-2	Neg.	—	Neg.	—	PN	PN	Steroide	Prodotto farmaceutico e veterinario
7	Apigenin	520-36-5	Neg.	—	Neg.	—	Neg.	Neg.	Composto eterociclico	Colorante, prodotto naturale, intermediario farmaceutico

	Sostanza [a]	N. CAS	Metodi di ER STTA [1]		Metodo VM7Luc ER TA [2]		Risposte attese ER STTA [4]	Consenso di classificazione ICC-VAM [5]	Classe chimica nel sistema MeSH [6]	Classe di prodotto [7]
			Attività di ER TA	IC_{50} [b] (M)	Attività di ER TA	IC_{50} [b], [3] (M)				
8	Atrazina	1912-24-9	Neg.	—	Neg.	—	Neg.	PN	Composto eterociclico	Erbicida
9	Di-n-butilftalato	84-74-2	Neg.	—	Neg.	—	Neg.	Neg.	Estere, acido ftalico	Ingrediente cosmetico, prodotto chimico industriale, plasticizzante
10	Fenarimol	60168-88-9	Neg.	—	Neg.	—	non testato	PN	Composto eterociclico, pirimidina	Fungicida
11	Flavone	525-82-6	Neg.	—	Neg.	—	PN	PN	Flavonoide, Composto eterociclico	Prodotto naturale, prodotto farmaceutico
12	Flutamide	13311-84-7	Neg.	—	Neg.	—	Neg.	PN	Ammide	Prodotto farmaceutico e veterinario
13	Genisteina	446-72-0	Neg.	—	Neg.	—	PN	Neg.	Flavonoide, Composto eterociclico	Prodotto naturale, prodotto farmaceutico
14	p-n-nonilfenolo	104-40-5	Neg.	—	Neg.	—	non testato	Neg.	Fenolo	Intermediario chimico

	Sostanza ([a])	N. CAS	Metodi di ER STTA ([1])		Metodo VM7Luc ER TA ([2])		Risposte attese ER STTA ([4])	Consenso di classificazione ICCVAM ([5])	Classe chimica nel sistema MeSH ([6])	Classe di prodotto ([7])
			Attività di ER TA	IC_{50} ([b]) (M)	Attività di ER TA	IC_{50} ([b]), ([3]) (M)				
15	Resveratrolo	501-36-0	Neg.	—	Neg.	—	PN	Neg.	Idrocarburo (ciclico)	Prodotto naturale

Abbreviazioni: N CAS = numero di registrazione CAS (*Chemical Abstracts Service Registry Number*). M = molare; IC_{50} = concentrazione della sostanza in esame che induce la metà dell'inibizione massima; Neg.= negativo; PN = presunto negativo; Pos.= positivo; PP = presunto positivo.

([a]) Sostanze comuni testate nei metodi di prova STTA e VM7Luc ER TA e classificate come antagoniste degli ER o negative e utilizzate per valutare l'esattezza nello studio di validazione del VM7Luc ER TA (2) (3).

([b]) La concentrazione massima testata in assenza di limitazioni dovute alla citotossicità o all'insolubilità era, rispettivamente, di 1×10^{-3} M (STTA) e 1×10^{-5} M (VM7Luc ER TA).

([1]) Valori riportati nel documento *Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity*, Parte B (2)

([2]) *ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists* (3).

([3]) I valori medi di IC_{50} sono stati calcolati a partire dai valori riportati dai laboratori coinvolti nello studio di valutazione del metodo VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM, e Hiyoshi) (3).

([4]) Attività di TA ER presunta in base agli effetti conosciuti riportati a partire dalla base di dati storici del CERI per la prova di legame agli ER, della prova uterotrofica e delle informazioni raccolte dalla letteratura (2).

([5]) Le sostanze sono classificate come antagoniste degli ER o negative in base alle informazioni riportate nei Background Review Documents (BRD) dell'ICCVAM relativi alle prove di legame agli ER e di TA ER (31), nonché ai dati ottenuti da pubblicazioni pubblicate ed esaminate dopo il completamento dei BRD dell'ICCVAM (2) (3) (18) (31).

([6]) Le sostanze sono state assegnate a una o più classi chimiche in applicazione del sistema MeSH (*Medicine's Medical Subject Headings*) della Biblioteca nazionale di medicina degli USA, una classificazione standardizzata riconosciuta a livello internazionale (disponibile all'indirizzo: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Le sostanze sono state assegnate a una o più classi di prodotto in applicazione della banca dati Hazardous Substances Data Bank della Biblioteca nazionale di medicina degli USA (disponibile all'indirizzo: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

COMPONENTI DEL METODO DI PROVA ER TA

Componenti essenziali del metodo di prova

11. La presente linea guida si applica ai metodi che utilizzano un recettore ERα trasfettato in modo stabile o endogeno e un costrutto con gene reporter trasfettato in modo stabile e regolato da uno o più componenti di risposta agli estrogeni; altri recettori, quali ERβ, possono tuttavia essere presenti. I seguenti elementi sono essenziali ai fini del metodo di prova.

Controlli

12. Sono descritte le ragioni che hanno portato a proporre gli standard di riferimento per la prova agonista e per la prova antagonista. I controlli inclusi simultaneamente nella prova (negativo, con solvente e positivo), come opportuno, servono ad indicare che il metodo di prova funziona alle condizioni sperimentali e forniscono gli elementi di comparazione tra esperimenti; essi rientrano generalmente tra i criteri di accettabilità di un determinato esperimento (1).

Procedure standard di controllo della qualità

13. Le procedure standard di controllo della qualità vanno eseguite come descritto per ciascun protocollo al fine di garantire che la linea cellulare rimanga stabile durante i molteplici passaggi, rimanga esente da micoplasma (ossia priva di contaminazione batterica) e conservi la capacità di fornire le risposte mediate dagli ER nel tempo. Le linee cellulari devono essere ulteriormente controllate per verificarne l'identità esatta e la presenza di altri contaminanti (ad esempio funghi, lieviti e virus).

Dimostrazione della competenza del laboratorio

14. Prima di testare sostanze chimiche sconosciute con uno qualsiasi dei metodi previsti dalla presente linea guida, ciascun laboratorio deve dimostrare la propria competenza ad eseguire il metodo di prova. Per dimostrare la competenza, ciascun laboratorio deve sottoporre a prova le 14 sostanze di prova a fini di competenza elencate nella tabella 3 per il saggio agonista e le 10 sostanze di prova a fini di competenza elencate nella tabella 4 per il saggio antagonista. La dimostrazione della competenza permette inoltre di confermare la reattività del sistema di prova. L'elenco delle sostanze da utilizzare per stabilire la competenza è un sottoinsieme delle sostanze di riferimento fornite negli standard di prestazione per i metodi di prova ER TA (6). Tali sostanze sono disponibili sul mercato, rappresentano le classi di sostanze chimiche comunemente associate all'attività agonista o antagonista degli ER, presentano una gamma di attività corrispondente alle affinità attese per gli agonisti/antagonisti degli ER (da debole a forte) e includono le sostanze negative. Le sostanze di prove a fini di competenza devono essere testate almeno due volte, in giorni diversi. La competenza è dimostrata quando ciascuna sostanza testata ai fini della competenza è classificata correttamente (risposta positiva/negativa). La prova ai fini della competenza è ripetuta da ciascun tecnico nell'ambito della formazione al presente metodo di prova. A seconda del tipo di cellula, alcune di queste sostanze di prova a fini di competenza possono comportarsi come SERM e presentare un'attività al tempo stesso agonista e antagonista. Tuttavia, nelle tabelle 3 e 4 le sostanze di prova a fini di competenza sono classificate in base alla loro attività conosciuta come prevalente, che sarà utilizzata per la valutazione della competenza a eseguire il metodo di prova.

15. Per dimostrare la competenza e a fini di controllo qualitativo ciascun laboratorio costruisce banche di dati storici agonisti e antagonisti con i dati dello standard di riferimento (ossia, 17β-estradiolo e tamoxifene), delle sostanze di controllo positive e negative e del controllo con solvente (ad es. DMSO). Inizialmente, la base di dati è generata a partire da almeno 10 prove agoniste indipendenti (ad es. 17β-estradiolo) e 10 prove antagoniste indipendenti (ad es. tamoxifene). Occorrerà aggiungervi i risultati di ulteriori analisi condotte su tali standard di riferimento e controlli con solvente in modo da ampliare la base di dati al fine di garantirne la coerenza e le prestazioni del biosaggio da parte del laboratorio nel corso del tempo.

Tabella 3

Elenco delle (14) sostanze di prova a fini di competenza per la prova agonista [8]

N° [7]	Sostanza	N. CAS	Risposta prevista [1]	Metodo STTA			Metodo VM7Luc ER TA		Classe chimica nel sistema MeSH [5]	Classe di prodotto [6]
				PC_{10} (M) [2]	PC_{50} (M) [2]	Intervallo di concentrazione della prova (M)	VM7Luc EC_{50} (M) [3]	Conc. più alta per il test di *range finding* (M) [4]		
14	Dietilstilbestrolo	56-53-1	Pos.	$< 1{,}00 \times 10^{-1-1}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} - 10^{-8}$	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Idrocarburo (ciclico)	Prodotto farmaceutico e veterinario
12	17α-estradiolo	57-91-0	Pos.	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Steroide	Prodotto farmaceutico e veterinario
15	*meso*-esestrolo	84-16-2	Pos.	$< 1{,}00 \times 10^{-1-1}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Idrocarburo (ciclico), fenolo	Prodotto farmaceutico e veterinario
11	4-*terz*-ottilfenolo	140-66-9	Pos.	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Fenolo	Intermediario chimico
9	Genisteina	446-72-0	Pos.	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Flavonoide, Composto eterociclico	Prodotto naturale, prodotto farmaceutico
6	Bisfenolo A	80-05-7	Pos.	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Fenolo	Intermediario chimico

Nº (7)	Sostanza	N. CAS	Risposta prevista (1)	Metodo STTA			Metodo VM7Luc ER TA		Classe chimica nel sistema MeSH (5)	Classe di prodotto (6)
				PC_{10} (M) (2)	PC_{50} (M) (2)	Intervallo di concentrazione della prova (M)	VM7Luc EC_{50} (M) (3)	Conc. più alta per il test di *range finding* (M) (4)		
2	Kaempferol	520-18-3	Pos.	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Flavonoide, Composto eterociclico	Prodotto naturale
3	Ftalato di butilbenzile	85-68-7	Pos.	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Acido carbossilico, estere, acido ftalico	Plasticizzante, prodotto chimico industriale
4	*p,p'*- Metossicloro	72-43-5	Pos.	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Idrocarburo (alogenato)	Pesticida, prodotto veterinario
1	Etilparabene	120-47-8	Pos.	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Acido carbossilico, fenolo	Prodotto farmaceutico, conservante
17	Atrazina	1912-24-9	Neg.	—	—	$10^{-10} - 10^{-4}$	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Composto eterociclico	Erbicida
20	Spironolattone	52-01-7	Neg.	—	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Lattone, steroide	Prodotto farmaceutico

N° (7)	Sostanza	N. CAS	Risposta prevista (1)	Metodo STTA			Metodo VM7Luc ER TA		Classe chimica nel sistema MeSH (5)	Classe di prodotto (6)
				PC_{10} (M) (2)	PC_{50} (M) (2)	Intervallo di concentrazione della prova (M)	VM7Luc EC_{50} (M) (3)	Conc. più alta per il test di *range finding* (M) (4)		
21	Chetoconazolo	65277-42-1	Neg.	—	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Composto eterociclico	Prodotto farmaceutico
22	Reserpina	50-55-5	Neg.	—	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Composto eterociclico, indolo	Prodotto farmaceutico e veterinario

Abbreviazioni: N CAS = numero di registrazione CAS (*Chemical Abstracts Service Registry Number*). EC_{50} = concentrazione efficace della sostanza in esame che induce una risposta pari alla metà della risposta massima; Neg. = negativo; Pos. = positivo; PC_{10} (e PC_{50}) = concentrazione della sostanza in esame per la quale la risposta è pari al 10 % (o 50 % per il valore PC_{50}) dell'attività massima indotta dal controllo positivo (E2, 1 nm) in ciascuna piastra.

(1) Le sostanze sono classificate come positive o negative per l'effetto agonista degli ER in base alle informazioni dei Background Review Documents (BRD) dell'ICCVAM per i saggi di legame agli ER e di TA ER (31) nonché su dati empirici e altre informazioni ottenuti da studi pubblicati e esaminati a seguito dei BRD dell'ICCVAM. (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

(2) I valori riportati nel documento *Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line* (30).

(3) I valori medi di EC_{50} sono stati calcolati a partire dai valori riportati dai laboratori coinvolti nello studio di valutazione del metodo VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM, e Hiyoshi) (3).

(4) Le concentrazioni indicate corrispondono alle concentrazioni più elevate testate (prova volta a determinare l'intervallo delle concentrazioni) durante la validazione del saggio di VM7Luc ER TA. Se le concentrazioni sono diverse tra i laboratori, viene comunicata la concentrazione più elevata. Cfr. la tabella 4-10 della relazione di valutazione del metodo di prova dell'ICCVAM; The LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: *An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals* (3).

(5) Le sostanze sono state assegnate a una o più classi chimiche in applicazione del sistema MeSH (Medicine's Medical Subject Headings) della Biblioteca nazionale US, una classificazione standardizzata riconosciuta a livello internazionale (disponibile all'indirizzo: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

(6) Le sostanze sono state assegnate a una o più classi di prodotto in applicazione del sistema MeSH (Medicine's Medical Subject Headings) della Biblioteca nazionale degli USA(disponibile all'indirizzo: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)

(7) Dalla tabella 1 (*List of Reference Chemicals (22) for Evaluation of ER Agonist Accuracy*) degli standard di prestazione (6)

(8) Se una sostanza chimica per la verifica della competenza tecnica non è più disponibile sul mercato, si può utilizzare una sostanza con la medesima classificazione, nonché affinità, modalità di azione e classe chimica comparabili.

Tabella 4

Elenco delle (10) sostanze di prova di competenza per la prova antagonista

	Sostanza ([a])	N. CAS	Metodo ER STTA ([1])			Metodo VM7Luc ER TA ([2])			Risposte attese ER STTA ([1])	ICCVAM ([5]) Consenso di classificazione nel sistema	MeSH ([6]) Classe chimica	Classe di prodotto ([7])
			Attività di ER TA	IC_{50} (M)	Intervallo di concentrazione della prova (M)	Attività di ER TA	IC_{50} ([3]) (M)	Conc. più alta per il test di *range-finding* (M) ([4])				
1	4-idrossitamoxifen	68047-06-3	Pos.	$3{,}97 \times 10^{-9}$	10^{-12} – 10^{-7}	Pos.	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	Pos. moderato	Pos.	Idrocarburo (ciclico)	Prodotto farmaceutico
2	Raloxifene HCl	82640-04-8	Pos.	$7{,}86 \times 10^{-10}$	10^{-12} – 10^{-7}	Pos.	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	Pos. moderato	Pos.	Idrocarburo (ciclico)	Prodotto farmaceutico
3	Tamoxifene	10540-29-1	Pos.	$4{,}91 \times 10^{-7}$	10^{-10} – 10^{-5}	Pos.	$8{,}17 \times 10^{-7}$	$2{,}69 \times 10^{-4}$	Pos.	Pos.	Idrocarburo (ciclico)	Prodotto farmaceutico
4	17β-estradiolo	50-28-2	Neg.	—	10^{-9} – 10^{-4}	Neg.	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Neg. (*)	PN	Steroide	Prodotto farmaceutico e veterinario
5	Apigenin	520-36-5	Neg.	—	10^{-9} – 10^{-4}	Neg.	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Neg.	Neg.	Composto eterociclico	Colorante, prodotto naturale, intermediario farmaceutico
6	Di-n-butilftalato	84-74-2	Neg.	—	10^{-8} – 10^{-3}	Neg.	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	Neg.	Neg.	Estere, acido ftalico	Ingrediente cosmetico, prodotto chimico industriale, plasticizzante

	Sostanza ([a])	N. CAS	Metodo ER STTA ([1])			Metodo VM7Luc ER TA ([2])			Risposte attese ER STTA ([1])	ICCVAM ([5]) Consenso di classificazione nel sistema	MeSH ([6]) Classe chimica	Classe di prodotto ([7])
			Attività di ER TA	IC_{50} (M)	Intervallo di concentrazione della prova (M)	Attività di ER TA	IC_{50} ([3]) (M)	Conc. più alta per il test di *range-finding* (M) ([4])				
7	Flavone	525-82-6	Neg.	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	Neg.	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	Neg. (*)	PN	Flavonoide, Composto eterociclico	Prodotto naturale, prodotto farmaceutico
8	Genisteina	446-72-0	Neg.	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	Neg.	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Neg. (*)	Neg.	Flavonoide, Composto eterociclico	Prodotto naturale, prodotto farmaceutico
9	p-n-nonilfenolo	104-40-5	Neg.	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	Neg.	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	non testato	Neg.	Fenolo	Intermediario chimico
10	Resveratrolo	501-36-0	Neg.	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	Neg.	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	Neg. (*)	Neg.	Idrocarburo (ciclico)	Prodotto naturale

Abbreviazioni: N CAS = numero di registrazione CAS (*Chemical Abstracts Service Registry Number*). M = molare; IC_{50} = concentrazione della sostanza in esame che induce la metà dell'inibizione massima; Neg.= negativo; PN = presunto negativo; Pos.= positivo.

(*) classificate negative in base alla letteratura (2).

([a]) Sostanze comuni testate nei saggi di STTA e VM7Luc ER TA e classificate come antagoniste degli ER o negative e utilizzate per valutare l'accuratezza nello studio di validazione del saggio di VM7Luc ER TA (2) (3).

([1]) Valori riportati nel documento *Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity*, Parte B (2)

([2]) ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

([3]) I valori medi di IC_{50} sono stati calcolati a partire dai valori riportati dai laboratori coinvolti nello studio di valutazione del metodo di VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM, e Hiyoshi) (3).

([4]) Le concentrazioni indicate corrispondono alle concentrazioni più elevate testate (prova per determinare l'intervallo delle concentrazioni) durante la validazione del saggio di VM7Luc ER TA. Se le concentrazioni sono diverse tra i laboratori, viene comunicata la concentrazione più elevata. Cfr. la tabella 4-10 della relazione di valutazione del metodo di prova dell'ICCVAM; *The LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals* (3).

([5]) Le sostanze sono classificate come antagoniste degli ER o negative in base alle informazioni riportate nei Background Review Documents (BRD) dell'ICCVAM relativi alle prove di legame agli ER e di TA ER (31), nonché ai dati ottenuti da pubblicazioni pubblicate ed esaminate dopo il completamento dei BRD dell'ICCVAM (2) (3) (18) (31).

([6]) Le sostanze sono state assegnate a una o più classi chimiche in applicazione del sistema MeSH (*Medicine's Medical Subject Headings*) della Biblioteca nazionale US, una classificazione standardizzata riconosciuta a livello internazionale (disponibile all'indirizzo: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Le sostanze sono state assegnate a una o più classi di prodotto in applicazione della banca dati Hazardous Substances Data Bank della Biblioteca nazionale di medicina degli USA (disponibile all'indirizzo: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

Criteri di accettabilità della batteria di prove

16. L'accettazione o il rigetto di una batteria di prove si basa sulla valutazione dei risultati ottenuti per gli standard di riferimento e i controlli utilizzati per ciascun esperimento. I valori di PC_{50} (EC_{50}) o IC_{50} per gli standard norme di riferimento devono soddisfare i criteri di accettabilità previsti per il metodo di prova selezionato (per il saggio STTA cfr. l'appendice 2, per il saggio VM7Luc ER TA cfr. l'appendice 3) e tutti i controlli positivi/negativi devono essere classificati in modo corretto per ciascun esperimento accettato. Un laboratorio dimostra la propria capacità di condurre un metodo di prova in modo omogeneo grazie alla creazione e al mantenimento di una banca di dati storici per gli standard di riferimento e per i controlli (cfr. il paragrafo 15). Le deviazioni standard (SD) o i coefficienti di variazione (CV) delle medie dei parametri di approssimazione delle curve degli standard di riferimento ottenuti dopo prove multiple possono essere utilizzati come misura di riproducibilità intra-laboratorio. Inoltre, devono essere rispettati i seguenti principi relativi ai criteri di accettabilità:

— I dati dovrebbero essere sufficienti per valutare in modo quantitativo il tasso di attivazione (per la prova sugli agonisti) o di inibizione (per la prova sugli antagonisti) (efficacia e potenza).

— L'attività media del marcatore ottenuto con la concentrazione di riferimento della sostanza estrogenica di riferimento è pari o superiore alla risposta minima specificata nei metodi di prova, con riferimento alla risposta del controllo con mezzo disperdente (con solvente) al fine di garantire un'adeguata sensibilità. Nel caso dei metodi di STTA e di TA ER VM7Luc, tali risultati corrispondono a quattro volte la risposta media del controllo con mezzo disperdente per ciascuna piastra.

— Le concentrazioni testate devono rimanere inferiori al limite di solubilità delle sostanze chimiche in esame e non presentare citotossicità.

Analisi dei dati

17. Per classificare una risposta come positiva o negativa, si applica la procedura di interpretazione dei dati definita per ciascun metodi di prova.

18. Il rispetto dei criteri di accettabilità (paragrafo 16) comprova che la prova funziona correttamente, ma non garantisce che qualsiasi prova produrrà dati accurati. Replicare i risultati della prima prova è la migliore indicazione che sono stati generati dati accurati. Se due batterie di prove danno risultati riproducibili (ad esempio, se entrambe concludono che una sostanza chimica è positiva), non è necessario effettuarne una terza.

19. due batterie di prove non forniscono risultati riproducibili (ad esempio, una sostanza chimica in esame è positiva in una e negativa nell'altra), o se è richiesto un maggiore grado di certezza per questo metodo di prova, dovrebbero essere condotte almeno tre batterie di prove indipendenti. In questo caso la classificazione si basa sui due risultati concordanti dei tre risultati ottenuti.

Criteri generali di interpretazione dei dati

20. Attualmente non esiste alcun metodo universalmente concordato per l'interpretazione dei dati di una prova ER TA. Tuttavia, la valutazione qualitativa (ad es. positivo/negativo) e/o quantitativa (ad es. EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}), dell'attività mediata dagli hrER deve fondarsi su dati empirici e giudizi scientificamente validi. Se possibile, i risultati positivi devono essere caratterizzati sia dall'entità dell'effetto indotto rispetto al controllo con mezzo disperdente (solvente) o all'estrogeno di riferimento sia dalla concentrazione alla quale si produce l'effetto (ad es. EC_{50}, PC_{50}, RPC_{Max}, IC_{50}, ecc.).

Relazione sull'esecuzione della prova

21. La relazione sull'esecuzione della prova deve includere le informazioni seguenti:

Metodo di prova:

— metodo di prova utilizzato;

— controlli/standard di riferimento/sostanza chimica in esame;

— origine, numero di lotto, data limite d'uso, se disponibili;

— stabilità della sostanza chimica in esame, se nota;

— solubilità e stabilità della sostanza chimica in esame nel solvente, se note;

— misurazione del pH, dell'osmolalità e del precipitato nel terreno di coltura a cui è stata aggiunta la sostanza chimica in esame, se del caso.

Sostanza monocostituente

— aspetto fisico, idrosolubilità e ulteriori proprietà fisico-chimiche pertinenti;

— dati di identificazione chimica: denominazioni IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula strutturale, identità chimica o impurezze, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc.

Sostanza multicostituente, UVCB e miscele

— caratterizzazione, per quanto possibile, mediante l'identità chimica dei costituenti (vedi sopra), loro presenza quantitativa e loro proprietà fisico-chimiche pertinenti.

Solvente/mezzo disperdente

— Caratterizzazione (natura, fornitore e lotto);

— motivazione della scelta del solvente/mezzo disperdente;

— solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/mezzo disperdente, se note.

Cellule

— tipo e origine delle cellule;

  • L'ER è espresso in modo endogeno? In caso contrario, quale o quali recettori sono stati trasfettati?

  • costrutto o costrutti di geni reporter utilizzati (comprese le specie di origine);

  • metodo di trasfezione;

  • metodo di selezione applicato per mantenere stabile una trasfezione(se del caso);

  • il metodo di trasfezione permette di ottenere linee stabili?

— numero di passaggi in coltura delle cellule (dopo scongelamento);

— numero di passaggi in coltura delle cellule al momento dello scongelamento;

— metodi usati per la conservazione delle colture cellulari.

Condizioni sperimentali

— limiti di solubilità;

— descrizione dei metodi di valutazione della vitalità applicati;

— composizione dei terreni di coltura, concentrazione di CO_2;

— concentrazione della sostanza chimica in esame;

— volume del mezzo disperdente e della sostanza chimica in esame aggiunto;

— temperatura di incubazione e umidità;

— durata del trattamento;

— densità cellulare all'inizio e durante il trattamento;

— standard di riferimento positivi e negativi;

— reagenti reporter (nome del prodotto, fornitore e lotto);

— criteri in base ai quali i risultati delle prove sono considerati positivi, negativi o equivoci.

Verifica dell'accettabilità:

— moltiplicazione dell'induzione in ciascuna piastra di prova e confronto con il minimo richiesto per il metodo di prova in base ai dati storici dei controlli;

— valori reali per i criteri di accettabilità, ad es. $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ e pendenza di Hill per i controlli positivi e standard di riferimento simultaneamente inclusi nella prova.

Risultati

— dati grezzi e normalizzati;

— livello di induzione massimo;

— dati relativi alla citotossicità;

— se esiste, la più bassa concentrazione efficace (LEC);

— valori RPC_{Max}, PC_{Max}, PC_{50}, IC_{50} e/o EC_{50}, come opportuno;

— relazione concentrazione-risposta, se possibile;

— eventuali analisi statistiche, assieme alla misura dell'errore e della confidenza (ad es. SEM, SD, CV o 95 % IC) e descrizione di come tali dati sono stati ottenuti.

Discussione dei risultati

Conclusione

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vit*ro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(4) Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer. Res., 58(23): p. 5367-73.

(5) Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research, 13(1): p. 67-82.

(6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(8) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: p. 20- 6.

(10) Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer, 16(4): p. 1073-89.

(11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): p. 63- 6.

(12) Jefferson W.N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, Journal of Chromatography B, 777(1-2): p. 179-189.

(13) Sonneveld E. *et al.* (2006). Comparison of I*n Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol.* Sci., 89(1): p. 173-187.

(14) Takeyoshi M. *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, Toxicology Letters, 126(2): p. 91- 98.

(15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, ATLA Alternatives to Laboratory Animals,28(1): p. 81-118.

(16) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol,71(10): p. 1459-69.

(17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol.* Lett, 102-103, 677-680.

(18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.

(19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor ß - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, Journal of Endocrinology, 163(3): p. 379-383.

(21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERα *In Vivo* and *In Vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): p. 122-126.

(22) Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,82(12): p. 4258-4265.

(23) Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): p. 204-211.

(24) Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): p. 105-12.

(25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): p. 1703-1714.

(26) Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): p. 558-568.

(27) Anderson J.N. Clark J.H. and Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): p. 1460-1468.

(28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): p. 515-522.

(29) Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: p. 45-80.

(30) Jensen E.V. *et al.* (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3):p. 547-569.

(31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505.).

(32) Kanno J. *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 109:785-94.

(33) Kanno J. *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530-1549.

(34) Kanno J. *et al.* (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.

(35) Geisinger *et al.* (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(36) Baldwin *et al.* (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(37) Li, Y. *et al.* (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(38) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

Appendice 1

DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI

Criteri di accettabilità: requisiti minimi di prestazione relativi ai controlli sperimentali e agli standard di riferimento. Tutti i criteri di accettabilità devono essere soddisfatti affinché un metodo di prova sia considerato valido.

Accuratezza (concordanza): grado di concordanza tra i risultati ottenuti con il metodo di prova e i valori di riferimento accettati. Misura l'efficienza del metodo di prova e costituisce un aspetto della pertinenza. Il termine è spesso utilizzato come sinonimo di "concordanza", per indicare la proporzione di risultati corretti di un metodo di prova (1).

Agonista: sostanza che provoca una risposta, ad esempio una trascrizione, quando si lega a un recettore specifico.

Antagonista: tipo di ligando di un recettore o tipo di sostanza chimica che non provoca, di per sé, una risposta biologica quando si lega a un recettore, ma blocca o attenua la risposta mediata dagli agonisti.

Attività antiestrogenica: capacità di una sostanza chimica di inibire l'azione del 17β-estradiolo mediata dai recettori estrogenici.

Morfologia cellulare: forma e aspetto delle cellule coltivate in monostrato in un unico pozzetto di una piastra di coltura tessutale. Le cellule che stanno per morire presentano spesso una morfologia anomala.

CF: quadro concettuale dell'OCSE per la sperimentazione e la valutazione degli interferenti endocrini.

Trattamento al carbone-destrano: trattamento del siero usato per la coltura cellulare. Spesso denominato *stripping*, questo trattamento con carbone rivestito di destrano permette di eliminare gli ormoni endogeni e le proteine che legano gli ormoni.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Citotossicità: effetti nocivi per la struttura o le funzioni della cellula che possono finire per provocare la morte cellulare e che possono manifestarsi mediante una riduzione del numero di cellule presenti nel pozzetto alla fine del periodo di esposizione o una riduzione della capacità di misurare una funzione cellulare rispetto al concomitante controllo con mezzo disperdente.

CV: coefficiente di variazione.

DCC-FBS: (*Dextran-coated charcoal treated fetal bovine serum*) siero bovino fetale trattato al carbone rivestito di destrano.

DMEM: (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*) mezzo di Eagle modificato da Dulbecco.

DMSO: dimetilsolfossido

E2: 17β-estradiolo

EC_{50}: concentrazione efficace di una sostanza chimica in esame che produce un effetto pari alla metà dell'effetto massimo.

ED: (*Endocrine disruption*) interferenza con il sistema endocrino.

hERα: recettore estrogenico alfa umano

hERß: recettore estrogenico beta umano

EFM: terreno di coltura privo di estrogeni. Si tratta del mezzo di Eagle modificato da Dulbecco (DMEM) integrato da 4,5 % di FBS trattato con carbone-destrano, 1,9 % di L-glutammina e 0,9 % di Pen-Strep.

ER: recettore estrogenico

ERE: elemento di risposta agli estrogeni

Attività estrogenica: capacità di una sostanza chimica di riprodurre la capacità del 17β-estradiolo di legarsi ai recettori estrogenici e di attivarli. L'attività estrogenica mediata dall'hERα può essere individuata mediante il presente metodo di prova.

ERTA: transattivazione dei recettori estrogenici

FBS: siero fetale bovino

HeLa: Linea cellulare immortalizzata derivata da cellule umane prelevate da cervice uterina

HeLa9903: subclone della linea cellulare HeLa trasfettato in modo stabile con un hERαα e un gene reporter della luciferasi

IC_{50}: concentrazione efficace di una sostanza chimica in esame che induce la metà dell'effetto massimo di inibizione.

ICCVAM: *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (comitato di coordinamento interagenzie per la validazione di metodi alternativi).

Riproducibilità inter-laboratori: espressione della misura in cui laboratori qualificati diversi possano ottenere, seguendo lo stesso protocollo e testando le stesse sostanze di prova, risultati simili in termini qualitativi e quantitativi. La riproducibilità inter-laboratori è determinata nel corso dei processi di pre-validazione e validazione e indica la misura in cui un metodo di prova può essere trasferito con successo tra laboratori; è detta anche riproducibilità tra laboratori (1).

Riproducibilità intra-laboratorio: espressione della misura in cui membri diversi del personale qualificato all'interno del medesimo laboratorio riescono a ottenere risultati simili da una prova effettuata seguendo un protocollo specifico in momenti diversi; è detta anche "riproducibilità all'interno dello stesso laboratorio" (1).

LEC: la concentrazione minima della sostanza chimica in esame che produce una risposta (ossia la più bassa concentrazione della sostanza chimica in esame alla quale l'incremento dell'effetto indotto è statisticamente diverso da quello del concomitante controllo con mezzo disperdente).

Test strutturalmente analoghi: espressione che indica un metodo di prova strutturalmente e funzionalmente analogo a un metodo di prova di riferimento validato e accettato. È sinonimo di "metodo di prova simile".

MT: metallotioneina

MMTV: (*Mouse Mammary Tumor Virus*) virus del tumore mammario dei topi

OHT: 4-idrossitamoxifene

PBTG: (*Performance-Based Test Guideline*) Linea guida basata su standard di prestazione

PC (controllo positivo): sostanza fortemente attiva, di preferenza il 17ß-estradiolo, inclusa in tutte le prove per contribuire a garantire il corretto funzionamento del metodo di prova.

PC_{10}: la concentrazione di una sostanza chimica in esame alla quale l'attività misurata nel corso di un metodo di prova è pari al 10 % dell'attività massima indotta dal controllo positivo (E2 a 1 nM per il metodo di STTA) in ciascuna piastra.

PC_{50}: la concentrazione di una sostanza chimica in esame alla quale l'attività misurata nel corso di un metodo di prova è pari al 50 % dell'attività massima indotta dal controllo positivo (E2 alla concentrazione di riferimento specificata nel metodo di prova) in ciascuna piastra.

PC_{Max}: la concentrazione di una sostanza chimica in esame che induce l'RPC_{Max}

Standard di prestazione: standard, basati su un metodo di prova validato, che consentono di valutare la comparabilità di un metodo di prova proposto che è simile sotto il profilo strutturale e funzionale. Comprendono: 1) gli elementi essenziali del metodo di prova; 2) un elenco minimo di sostanze chimiche di riferimento scelte tra le sostanze utilizzate per dimostrare le prestazioni accettabili del metodo di prova validato; e 3) in funzione dei risultati ottenuti con il metodo di prova validato, i livelli comparabili di accuratezza e affidabilità che il metodo proposto dovrebbe ottenere quando viene valutato utilizzando l'elenco minimo di sostanze chimiche di riferimento (1).

Sostanze di prova ai fini di competenza: sottoinsieme delle sostanze di riferimento incluse negli standard di prestazione che possono essere utilizzate da un laboratorio per dimostrare la sua competenza tecnica ad effettuare un metodo di prova standardizzato. In generale, i criteri di selezione per tali sostanze includono la rappresentatività di tutta la gamma delle risposte, la loro disponibilità sul mercato e l'esistenza di dati di riferimento di elevata qualità a loro corredo.

Competenza: la capacità di eseguire correttamente un metodo di prova, dimostrata prima di testare sostanze sconosciute.

Sostanza estrogenica di riferimento (controllo positivo, PC): 17β-estradiolo (E2, CAS 50-28-2).

Standard di riferimento: sostanza di riferimento usata per dimostrare l'adeguatezza di un metodo di prova. Il 17β-estradiolo è lo standard di riferimento per i metodi di STTA e VM7Luc ER TA.

Metodi di prova di riferimento: i metodi su cui si basa la linea guida PBTG 455.

Pertinenza: descrizione del rapporto tra la prova e l'effetto studiato; indica se la prova è significativa e utile per uno scopo specifico. È il grado con cui la prova misura o prevede correttamente l'effetto biologico di interesse. La pertinenza comprende una valutazione dell'accuratezza (concordanza) di una prova (1).

Affidabilità: misura in cui l'esecuzione di un metodo di prova può essere riprodotta nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi seguendo il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità intra-laboratorio e inter-laboratori.

RLU: unità relative di luce

RNA: acido ribonucleico

RPC_{Max}: livello massimo di risposta indotto da una sostanza chimica in esame, espresso in percentuale della risposta indotta da 1 nM di E2 sulla stessa piastra

RPMI: terreno di coltura RPMI 1 640 integrato da 0,9 % di Pen-Strep e 8,0 % di siero fetale bovino (FBS)

Batteria di prove: singolo esperimento che valuta l'azione della sostanza chimica sull'aspetto biologico del metodo di prova. Ciascuna batteria di prove consiste in un esperimento completo eseguito su pozzetti in replicato, contemporaneamente e con cellule che provengono dalla medesima riserva di cellule.

Batteria di prove indipendente: esperimento distinto e indipendente che valuta l'azione della sostanza chimica sull'aspetto biologico del metodo di prova, utilizzando cellule provenienti da una diversa riserva di cellule, sostanze chimiche diluite di recente, ed eseguito in giorni diversi oppure lo stesso giorno ma da personale diverso.

SD: deviazione standard

Sensibilità: proporzione di tutte le sostanze positive/attive correttamente classificate dal metodo di prova. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante da prendere in considerazione nel valutare la pertinenza di un metodo di prova (1).

Specificità: proporzione di tutte le sostanze negative/inattive correttamente classificate dal metodo di prova. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante da prendere in considerazione nel valutare la pertinenza di un metodo di prova (1).

Trasfezione stabile: processo che consiste nel trasfettare DNA nelle cellule di coltura in modo tale che esso sia stabilmente integrato nel loro genoma, il che permette l'espressione stabile di geni trasfettati. Cloni di cellule trasfettate stabilmente sono quindi selezionati con marcatori stabili (ad esempio in funzione della loro resistenza al G418).

Saggio di STTA: *Stably Transfected Transactivation Assay*, il saggio di transattivazione degli ERα basato sulla linea cellulare HeLa 9 903.

Studio: l'intera gamma di lavori sperimentali eseguiti per valutare un'unica sostanza specifica mediante un metodo di prova specifico. Uno studio comprende tutte le fasi, incluse le prove di diluizione della sostanza chimica in esame nel mezzo di prova, la batteria di prove preliminari volte a determinare l'intervallo delle concentrazioni, tutte le necessarie batterie di prove complete, l'analisi dei dati, l'assicurazione della qualità, la valutazione della citotossicità, ecc. Il completamento di uno studio consente la classificazione dell'attività della sostanza chimica in esame rispetto al tipo di tossicità (ossia attivo, inattivo o non conclusivo) valutata con il metodo di prova e permette una stima dell'efficacia rispetto alla sostanza di riferimento positiva.

Sostanza: nel contesto del REACH ([1]), per «sostanza» si intende un elemento chimico e i suoi composti, allo stato naturale od ottenuti per mezzo di un procedimento di fabbricazione, compresi gli additivi necessari a mantenerne la stabilità e le impurezze derivanti dal procedimento utilizzato, ma esclusi i solventi che possono essere separati senza compromettere la stabilità della sostanza o modificarne la composizione. Una definizione molto simile è utilizzata nel contesto del GHS delle Nazioni Unite (1).

TA (transattivazione): avvio della sintesi di mRNA in risposta a un segnale chimico specifico, come il legame di un estrogeno al un recettori estrogenico.

Metodo di prova: nel contesto del presente metodo di prova, un metodo di prova è una delle metodologie riconosciute valide per soddisfare i criteri di prestazione indicati. Le componenti del metodo di prova comprendono, ad esempio, la linea cellulare specifica con le condizioni di crescita associate, i terreni di coltura specifici in cui è condotta la prova, le condizioni di configurazione della piastra, la disposizione e le diluizioni delle sostanze chimiche in esame, nonché tutte le altre misure richieste per il controllo della qualità e le relative fasi di valutazione dei dati.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata applicando il presente metodo di prova.

Trascrizione: sintesi dell'RNA messaggero

UVCB: sostanze di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali biologici

Metodo di prova validato: saggio per il quale sono stati completati studi di validazione volti a determinare la pertinenza (compresa l'accuratezza) e l'affidabilità per uno scopo specifico. Va sottolineato che un metodo di prova validato potrebbe non avere una prestazione sufficiente in termini di accuratezza e affidabilità per essere ritenuto accettabile per lo scopo determinato (1).

Validazione: il processo mediante il quale si stabilisce l'affidabilità e la pertinenza di uno specifico approccio, metodo, saggio, processo o di una specifica valutazione per un determinato scopo (1).

VC (controllo con mezzo disperdente): Il solvente utilizzato per dissolvere le sostanze chimiche in esame e di controllo è testato unicamente come mezzo disperdente, senza la sostanza chimica disciolta.

VM7: cellule immortalizzate di adenocarcinoma che esprimono i recettori di estrogeni in modo endogeno.

VM7Luc4E2: la linea cellulare VM7Lu4E2 è derivata da cellule VM7 immortalizzate di adenocarcinoma di origine umana capaci di esprimere i due tipi di recettori estrogenici (ERα e ERβ) in maniera endogena e che sono state trasfettate in modo stabile con il plasmide pGudLuc7.ERE. Questo plasmide contiene quattro copie di un oligonucleotide di sintesi contenente l'elemento di risposta agli estrogeni a monte del promotore del virus del tumore mammario del topo (MMTV) e il gene reporter della luciferasi di lucciola.

Controllo positivo debole: sostanza debolmente attiva selezionata tra le sostanze chimiche di riferimento, inclusa in tutte le prove per contribuire a garantire il corretto funzionamento del metodo di prova.

([1]) Regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 18 dicembre 2006, concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'Agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la direttiva 1999/45/CE e che abroga il regolamento (CEE) n. 793/93 del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive della Commissione 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE (GU L 304 del 22.11.2007, pag. 1).

Appendice 2

SAGGIO DI TRANSATTIVAZIONE MEDIANTE IL RECETTORE ESTROGENICO ALFA UMANO TRASFETTATO IN MODO STABILE PER L'INDIVIDUAZIONE DELL'ATTIVITÀ AGONISTA E ANTAGONISTA DELLE SOSTANZE CHIMICHE UTILIZZANDO LA LINEA CELLULARE HERA-HELA-9903

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI (CFR. ANCHE INTRODUZIONE GENERALE)

1. Il presente saggio di transattivazione (TA) utilizza la linea cellulare HERα-HeLa-9 903 per individuare l'attività estrogenica agonista mediata dal recettore estrogenico alfa umano (hERα). Lo studio di validazione del saggio di transattivazione mediante trasfezione stabile (STTA) condotto dall'Istituto giapponese di ricerca e valutazione delle sostanze chimiche (CERI), che utilizza la linea cellulare hERα-HeLa-9 903 per individuare l'attività estrogenica agonista e antagonista mediata dal recettore estrogenico alfa umano (hERα), ha dimostrato la pertinenza e l'affidabilità del saggio per lo scopo previsto (1).

2. Il presente metodo di prova è concepito in modo specifico per individuare la transattivazione mediata dall'hERα misurando la chemiluminescenza come endpoint. Tuttavia, segnali di luminescenza non mediati dai recettori sono state riportati per concentrazioni di fitoestrogeni superiori a 1 μM, a motivo della sovrattivazione del gene reporter della luciferasi (2) (3). Mentre la curva dose-risposta indica che la reale attivazione del sistema ER avviene a concentrazioni inferiori, l'espressione della luciferasi ottenuta a concentrazioni elevate di fitoestrogeni o di composti simili sospettati di indurre una sovrattivazione del gene reporter della luciferasi mediante un meccanismo analogo a quello dei fitoestrogeni deve essere esaminata con attenzione nei sistemi di prova di ER TA trasfettati in modo stabile (appendice 1).

3. Le sezioni "INTRODUZIONE GENERALE" e "COMPONENTI DEL METODO DI PROVA DI LEGAME ER TA" vanno lette prima di applicare il presente metodo di prova per fini regolamentari. Le definizioni e le abbreviazioni utilizzate nella presente linea guida figurano nell'appendice 2.1.

PRINCIPIO DEL METODO DI PROVA (CFR. ANCHE INTRODUZIONE GENERALE)

4. Il metodo di prova è condotto per segnalare il legame di un ligando a un recettore estrogenico. Una volta stabilito tale legame, il complesso recettore-ligando trasloca verso il nucleo nel quale si fissa a elementi di risposta specifici del DNA e transattiva il gene reporter della luciferasi di lucciola, il che risulta in una maggiore espressione cellulare dell'enzima luciferasi. La luciferina è un substrato trasformato dall'enzima luciferasi in prodotto bioluminescente misurabile quantitativamente con un luminometro. L'attività della luciferasi può essere valutata in modo rapido e poco costoso grazie ai numerosi kit di analisi disponibili in commercio.

5. Il sistema di prova utilizza la linea cellulare hERα-HeLa-9 903, derivata da un tumore della cervice uterina di origine umana, che comporta due costrutti trasfettati stabilmente: i) il costrutto di espressione dell'hERαα (che codifica il recettore umano a lunghezza intera), e ii) un costrutto del gene reporter della luciferasi di lucciola che porta cinque sequenze ripetute in tandem di un elemento di risposta agli estrogeni (ERE) della vitellogenina e indotto da un elemento promotore della metallotioneina (MT) del ratto con motivo TATA. È stato dimostrato che il gene MT TATA di ratto produce i migliori risultati ed è quindi comunemente utilizzato. Di conseguenza, la linea cellulare hERα-HeLa-9 903 permette di misurare la capacità di una sostanza chimica di indurre una transattivazione dell'espressione del gene della luciferasi mediata dall'hERα.

6. Nel caso del saggio agonista degli ER, l'interpretazione dei dati poggia sul criterio seguente: il livello di risposta massimo indotto da una sostanza chimica in esame è superiore o uguale a una risposta agonista corrispondente al 10 % della risposta provocata da una concentrazione che induce una risposta massima del controllo positivo, ossia 1 nM di 17β-estradiolo (E2), cioè un valore PC_{10})? Nel caso del saggio antagonista, l'interpretazione dei dati poggia sul criterio seguente: la risposta mostra una riduzione di almeno il 30 % dell'attività rispetto alla risposta indotta dal controllo che produce il picco (25 pM di E2) senza citotossicità? L'analisi e l'interpretazione dei dati sono discusse in dettaglio nei paragrafi 34-48.

PROCEDURA

Linee cellulari

7. Per il presente metodo di prova si utilizza la linea cellulare hERα-HeLa-9 903 trasfettata in modo stabile. La linea cellulare può essere ottenuta presso la banca cellulare JCRB (*Japanese Collection of Research Bioresources*) ([1]) previa sottoscrizione di un accordo di trasferimento di materiale (*Material Transfer Agreement*, MTA).

8. Per il presente metodo di prova si utilizzano solo cellule esenti da micoplasmi. Il metodo migliore di individuazione sensibile di un'infezione da micoplasma è il RT-PCR (reazione a catena della polimerasi in tempo reale) (4) (5) (6).

Stabilità della linea cellulare

9. Per monitorare la stabilità della linea cellulare, è opportuno utilizzare l'E2, il 17α-estradiolo, il 17-α-metiltestosterone e il corticosterone come standard di riferimento per la prova sugli agonisti; è inoltre opportuno che la curva concentrazione-risposta completa sia misurata sull'intero intervallo di concentrazioni di prova indicate nella tabella 1 almeno una volta nel corso della conduzione della prova e che i risultati siano conformi a quelli riportati nella tabella 1.

10. Nel caso della prova sugli antagonisti, è opportuno misurare simultaneamente curve di concentrazione complete per due standard di riferimento, il tamoxifene e il flutamide, in ciascuna batteria di prove. Occorre controllare che la classificazione qualitativa sia correttamente individuata come positiva o negativa per le due sostanze chimiche.

Condizioni di coltura e di piastratura delle cellule

11. Le cellule sono mantenute in un mezzo minimo essenziale di Eagle (EMEM) senza rosso fenolo, integrato da 60 mg/l di antibiotico (Kanamicina) e 10 % di siero bovino fetale trattato al carbone-destrano (DCC-FBS), in un incubatore con CO_2 (5 % di CO_2) a 37 ± 1 °C. Quando è raggiunta una confluenza del 75 -90 %, le cellule possono essere suddivise in colture secondarie di 10 ml contenenti 0,4 x 10^5 – 1 x 10^5 cellule/ml in piastre per colture cellulari di 100 mm di diametro. Le cellule sono messe in sospensione in FBS-EMEM al 10 % (equivalente a EMEM con DCC-FBS) e poi piastrate nei pozzetti di una micropiastra fino a una densità di 1 x 10^4 cellule/100 µl/pozzetto. Successivamente, le cellule sono preincubate in un incubatore con 5 % di CO_2 a 37 ± 1 °C per 3 ore prima dell'esposizione alla sostanza chimica. Il materiale in plastica deve essere esente da qualsiasi attività estrogenica.

12. Per preservare l'integrità della risposta, le cellule coltivate sono sottoposte a passaggio dallo stock congelato al mezzo di coltura condizionato; il numero di passaggi non deve superare 40. Per la linea cellulare hERα-HeLa-9 903, ciò avviene in meno di tre mesi. Tuttavia, la prestazione delle cellule può essere ridotta se le cellule sono coltivate in condizioni colturali inadeguate.

13. Il DCC-FBS può essere preparato come descritto nell'appendice 2.2 o ottenuto da fonti commerciali.

Criteri di accettabilità

Standard di riferimento positivi e negativi per la prova sugli agonisti degli ER

14. Prima e durante lo studio occorre verificare la reattività del sistema di prova usando le concentrazioni appropriate di un forte estrogeno E2, di un estrogeno debole (17α-estradiolo), di un agonista molto debole (17α-metiltestosterone) e di una sostanza che induce una risposta negativa (corticosterone). L'intervallo dei valori accettabili derivanti dallo studio di validazione (1) sono riportati nella tabella 1. Questi 4 standard di riferimento concomitanti sono inclusi in ciascun esperimento e i risultati devono rientrare entro i limiti accettabili stabiliti. In caso contrario, occorre determinare la causa del mancato rispetto dei criteri di accettabilità (ad esempio, manipolazione cellulare, la qualità e la concentrazione di siero e antibiotici) e la prova va ripetuta. Quando i criteri di accettabilità sono soddisfatti, è

([1]) JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan Fax: +81-72-641-9812.

essenziale utilizzare in modo coerente i materiali di coltura cellulare per garantire una variabilità minima dei valori EC_{50}, PC_{50} and PC_{10}. I quattro standard di riferimento concomitanti, che vanno inclusi in ciascun esperimento (condotto nelle medesime condizioni, inclusi i materiali, il livello di passaggio delle cellule e i tecnici), garantiscono la sensibilità della prova nella misura in cui i valori PC_{10} dei tre standard di riferimento positivi rientrano nell'intervallo accettabile, così come i valori PC_{50} e EC_{50} laddove possono essere calcolati (cfr. tabella 1).

Tabella 1

Intervallo dei valori accettabili dei quattro standard di riferimento per la prova sugli agonisti degli ER

Nome	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Pendenza di Hill	Intervallo di prova
17β-estradiolo (E2) N. CAS: 50-28-2	-11,4~-10,1	<-11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10-14~10-8M
17α-estradiolo N. CAS: 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10-12~10-6M
Corticosterone N. CAS: 50-22-6	—	—	—	—	10-10~10-4M
17α-metiltestosterone N. CAS: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	—	—	10-11~10-5M

Standard di riferimento positivi e negativi per la prova sugli antagonisti degli ER

15. Prima e durante lo studio occorre verificare la reattività del sistema di prova usando le concentrazioni appropriate di una sostanza positiva (tamoxifene) e di una sostanza negativa (flutamide). L'intervallo dei valori accettabili derivanti dallo studio di validazione (1) sono riportati nella tabella 2. Questi 2 standard di riferimento concomitanti sono inclusi in ciascun esperimento e i risultati devono permettere di classificarli correttamente, come indicato nei criteri. In caso contrario, occorre determinare la causa del mancato rispetto dei criteri (ad esempio, manipolazione cellulare, la qualità e la concentrazione di siero e antibiotici) e la prova va ripetuta. Occorre inoltre calcolare i valori IC_{50} per una sostanza positiva (tamoxifene) e i risultati devono rientrano nei limiti accettabili indicati. Quando i criteri di accettabilità sono soddisfatti, è essenziale utilizzare in modo coerente i materiali di coltura cellulare per garantire una variabilità minima dei valori IC_{50}. I due standard di riferimento concomitanti, concomitanti, che vanno inclusi in ciascun esperimento (condotto nelle stesse condizioni, inclusi i materiali, il livello di passaggio delle cellule e i tecnici), possono garantire la sensibilità della prova (cfr. tabella 2).

Tabella 2

Criteri e intervallo dei valori accettabili dei due standard di riferimento per la prova sugli antagonisti degli ER

Nome	Criteri	$LogIC_{50}$	Intervallo di prova
Tamoxifene N. CAS: 10 540-29-1	positivo: Va calcolato il valore IC_{50}	-5,942~-7,596	10-10~10-5M
Flutamide N. CAS: 13 311-84-7	negativo: Non va calcolato il valore IC_{30}	—	10-10 10-5M

Controllo positivo e controllo con mezzo disperdente

16. Il controllo positivo (PC) per la prova sugli agonisti (1 nM di E2) e la prova sugli antagonisti (10 μM TAM) degli ER deve essere testato almeno in triplicato in ciascuna piastra. Il mezzo disperdente usato per sciogliere la sostanza chimica in esame deve essere testato come controllo con mezzo disperdente (VC) almeno in triplicato in ciascuna piastra. Oltre a questo VC, se il controllo positivo utilizza un mezzo disperdente diverso da quello della sostanza chimica in esame, questo altro mezzo disperdente deve essere testato almeno in triplicato sulla stessa piastra del controllo positivo.

Criteri di qualità per la prova sugli agonisti degli ER

17. L'attività della luciferasi media del controllo positivo (1 nM di E2) deve essere almeno pari a 4 volte quella dell'attività media del VC su ciascuna piastra. La scelta di questo criterio poggia sull'attendibilità dei valori degli endpoint derivanti dallo studio di validazione (storicamente aumenti di induzione tra 4 e 30 volte).

18. Per quanto riguarda il controllo della qualità della prova, l'aumento di induzione corrispondente al valore PC_{10} nel controllo positivo concomitante (1 nM di E2) deve essere superiore a 1 + 2 SD del valore iniziale di induzione (= 1) del controllo con mezzo disperdente concomitante. Ai fini della definizione delle priorità, il valore PC_{10} può essere utile per semplificare l'analisi dei dati richiesta rispetto a un'analisi statistica. Sebbene fornisca informazioni sulla significatività statistica, un'analisi statistica non costituisce un parametro quantitativo per quanto riguarda il potenziale basato sulle concentrazioni, ed è pertanto meno utile ai fini della definizione delle priorità.

Criteri di qualità per la prova sugli antagonisti degli ER

19. L'attività della luciferasi media del controllo che produce il picco (25 nM di E2) deve essere almeno pari a 4 volte quella dell'attività media del VC per ciascuna piastra. La scelta di questo criterio poggia sull'attendibilità dei valori degli endpoint derivanti dallo studio di validazione.

20. Per quanto riguarda il controllo di qualità del metodo di prova, l'attivazione trascrizionale relativa (RTA) di 1 nM di E2 deve superare il 100 %, l'RTA di 1μM di 4-idrossitamoxifene (OHT) deve essere inferiore a 40,6 % e l'RTA di 100 μM di digitonina (Dig) inferiore a 0 %.

Dimostrazione della competenza del laboratorio (cfr. il paragrafo 14 e le tabelle 3 e 4 nella sezione «COMPONENTI DEL METODO DI PROVA DI LEGAME ER TA» di questo metodo di prova).

Mezzo disperdente

21. Il dimetilsolfossido (DMSO), o un solvente idoneo, è utilizzato come controllo con mezzo disperdente concomitante alla stessa concentrazione usata per i diversi controlli positivi e negativi e per le sostanze chimiche in esame. Le sostanze chimiche in esame vanno disciolte in un solvente capace di solubilizzarle che sia miscibile con il mezzo di coltura cellulare. L'acqua, l'etanolo (purezza tra il 95 % e il 100 %) e il DMSO sono mezzi disperdenti idonei. Se si usa il DMSO, il livello non deve superare lo 0,1 % (v/v). Per ogni mezzo disperdente va dimostrato che il volume massimo utilizzato non è citotossico e non interferisce con le prestazioni della prova.

Preparazione della sostanza chimica di prova

22. In generale, le sostanze chimiche in esame vanno sciolte in DMSO o in altro solvente idoneo; tale preparazione è quindi frazionata in serie di soluzioni identiche diluite con lo stesso solvente in rapporto 1:10. Tali soluzioni sono destinate alla diluizione con i terreni di coltura.

Solubilità e citotossicità: considerazioni sulla prova preliminare di determinazione delle concentrazioni

23. Occorre effettuare una prova preliminare per determinare l'adeguato intervallo (*range-finding*) delle concentrazioni della sostanza chimica da testare e verificare se la sostanza chimica in esame può presentare eventuali problemi di solubilità e di citotossicità. In un primo tempo le sostanze chimiche sono testate fino alla concentrazione massima di 1 μl/ml, 1 mg/ml o 1 mM (si scelga il valore più basso). Sulla base del grado di citotossicità o della mancanza di solubilità osservato nella prova preliminare, la prima batteria di prove definitiva deve testare la sostanza chimica a diluizioni in serie logaritmica, partendo dalla massima concentrazione accettabile (ad esempio 1 mM, 100 μM, 10 μM, ecc.); va riportata la presenza di intorbidimento o precipitato o citotossicità. Le prove sono ripetute una seconda e, se necessario, una terza volta adeguando le concentrazioni per caratterizzare meglio la curva concentrazione-risposta ed evitare le concentrazioni alle quali la sostanza chimica è risultata insolubile o eccessivamente citotossica.

24. Per quanto riguarda gli agonisti e gli antagonisti degli ER, l'interpretazione dei dati tiene conto dell'influenza di livelli crescenti di citotossicità che possono alterare in modo significativo o eliminare la risposta sigmoide tipica. Vanno applicati metodi di prova della citotossicità in grado di fornire informazioni sulla vitalità cellulare dell'80 %, mediante un apposito test basato sull'esperienza del laboratorio.

25. Se i risultati della prova di citotossicità indicano che la concentrazione della sostanza chimica in esame ha ridotto del 20 % o più il numero di cellule, occorre considerare citotossica tale concentrazione e escludere dalla valutazione tutte le concentrazioni pari o superiori a tale soglia.

Esposizione alla sostanza chimica di prova e configurazione delle piastre di prova

26. La procedura per le diluizioni delle sostanze chimiche (fasi 1 e 2) e l'esposizione alle cellule (fase 3) possono essere eseguite come segue:

Fase-1: Diluire in serie ciascuna sostanza chimica in esame in DMSO, o in un solvente idoneo; ciascuna diluizione è versata nei pozzetti di una piastra da microtitolazione per ottenere le serie di concentrazioni finali, come stabilito precedentemente nella prova di determinazione dell'intervallo di concentrazioni (generalmente in una gamma che comprende, ad esempio, mM, 100 µM, 10 µM, 1µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, and 10 pM (10^{-3}-10^{-11} M)] per le prove in triplicato.

Fase-2: diluizione della sostanza chimica: in primo luogo diluire 1,5 µl della sostanza chimica in esame nel solvente a un volume di 500 µl di mezzo di coltura.

Fase-3: esposizione delle cellule alla sostanza chimica: aggiungere 50 µl della diluizione nel mezzo di coltura (preparato nella fase 2) in un pozzetto di prova contenente 10^4 cellule/ 100 µl/pozzetto.

Il volume finale di mezzo di coltura raccomandato in ciascun pozzetto è di 150 µl. I campioni di prova e gli standard di riferimento possono essere ripartiti come indicato nella tabella 3 e nella tabella 4.

Tabella 3

Esempio di ripartizione delle concentrazioni degli standard di riferimento nella piastra di prova in una prova sugli agonisti degli ER

Riga	17α-metiltestosterone			Corticosterone			17α-estradiolo			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	conc 1 (10 µM)	→	→	100 µM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	conc 2 (1 µM)	→	→	10 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	conc 3 (100 nM)	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	conc 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	conc 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	conc 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	conc 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: controllo con mezzo disperdente (0,1 % di DMSO) PC: controllo positivo (1 nM di E2)

27. Gli standard di riferimento (E2, 17-α-estradiolo, 17α-metiltestosterone e corticosterone) sono inclusi in ciascuna prova (tabella 3) Ciascuna piastra di prova (tabella 4) include anche pozzetti contenenti il controllo positivo, trattati con 1 nM di E2 che può provocare un'induzione massima di E2, e pozzetti contenenti il controllo con mezzo disperdente, trattati con il DMSO (o solvente idoneo) solo. Se sono utilizzate cellule provenienti da fonti differenti (ad esempio numero di passaggi diversi, lotti diversi, ecc.), gli standard di riferimento vanno testati per ciascuna fonte cellulare.

Tabella 4

VC: controllo con mezzo disperdente (0,1 % di DMSO) PC: controllo positivo (1 nM di E2)

Riga	Sost. in esame 1			Sost. in esame 2			Sost. in esame 3			Sost. in esame 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	conc 1 (10 µM)	→	→	1 mM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	conc 2 (1 µM)	→	→	100 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	conc 3 (100 nM)	→	→	10 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	conc 4 (10 nM)	→	→	1 µM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	conc 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	conc 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	conc 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

Esempio di ripartizione delle concentrazioni delle sostanze chimiche in esame e degli standard di controllo nella piastra di prova in una prova sugli agonisti degli ER

Tabella 5

Esempio di ripartizione delle concentrazioni degli standard di riferimento nella piastra di prova in una prova sugli antagonisti degli ER

Riga	Tamoxifene			Flutamide			Sost. in esame 1			Sost. in esame 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	conc 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	conc 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	conc 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	conc 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	conc 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	conc 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % di DMSO	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: controllo trattato solo con mezzo disperdente (0,1 % di DMSO), PC: controllo positivo (1 nM di E2), OHT :4-idrossitamoxifene, Dig: Digitonina.

= addizionata di 25 pM di E2

28. Per valutare l'attività antagonista delle sostanze chimiche occorre addizionare i pozzetti di prova situati nelle righe da A a G con 25 pM di E2. Gli standard di riferimento (tamoxifene e flutamide) vanno testati in ciascuna batteria di prove. Ciascuna piastra di prova include anche pozzetti contenenti il controllo positivo (PC), trattati con 1 nM di E2 che possono fungere da controllo della qualità della linea cellulare hERα-HeLa-9 903, pozzetti contenenti il controllo con mezzo disperdente (VC) trattati con DMSO (o con solvente idoneo), pozzetti contenenti 0,1 % di DMSO, trattati con DMSO aggiunto alla concentrazione di E2 addizionata e corrispondente al «controllo addizionato», pozzetti trattati con una concentrazione finale di 1 μM OHT e pozzetti trattati con 100 μM di Dig (tabella 5). La piastra di prova successiva deve seguire la medesima disposizione sulla piastra, senza i pozzetti contenenti gli standard di riferimento (tabella 6). Se sono utilizzate cellule provenienti da fonti differenti (ad esempio numero di passaggi diversi, lotti diversi, ecc.), gli standard di riferimento vanno testati per ciascuna fonte cellulare.

Tabella 6

Esempio di ripartizione delle concentrazioni delle sostanze chimiche in esame e degli standard di controllo nella piastra di prova nella prova sugli antagonisti degli ER

Riga	Sost. in esame 1			Sost. in esame 2			Sost. in esame 3			Sost. in esame 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	conc 1 (10 μM)	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→
B	conc 2 (1 μM)	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→
C	conc 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	conc 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	conc 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	conc 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % di DMSO	→	→	→	→	→	1 μM OHT	→	→	100 μM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: controllo trattato solo con mezzo disperdente (0,1 % di DMSO), PC: controllo positivo (1 nM di E2), OHT :4-idrossitamoxifene, Dig: Digitonina.

: addizionato con 25 pM di E2.

29. La mancanza di effetti di bordo dovrebbe essere confermata, a seconda dei casi, e qualora esista il sospetto che tali effetti possano prodursi, occorre modificare la disposizione sulla piastra in modo da evitare che ciò si verifichi. Ad esempio, può essere seguita una disposizione sulla piastra che escluda l'utilizzo dei pozzetti situati sul bordo.

30. Dopo l'aggiunta delle sostanze chimiche, le piastre di prova sono collocate in un incubatore a 5 % di CO_2 a 37 ± 1 °C per 20-24 ore, al fine di indurre la sintesi di prodotti di geni reporter.

31. Quando si tratta di composti ad elevata volatilità, vanno applicate considerazioni particolari. In questi casi i pozzetti di controllo adiacenti possono generare falsi positivi e ciò va considerato alla luce dei valori di controllo storici e previsti. Nei pochi casi in cui la volatilità può destare preoccupazione, si raccomanda l'utilizzo di dispositivi di chiusura «ermetica» per le piastre in modo da isolare efficacemente i singoli pozzetti durante la sperimentazione.

32. Per garantire l'indipendenza dei risultati occorre ripetere le prove definitive per la stessa sostanza chimica in giorni diversi.

Prova della luciferasi

33. Per questa prova può essere utilizzato un reagente commerciale [ad esempio Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510, o equivalente)] o un sistema di prova della luciferasi standard (ad es. Promega, E1500, o equivalente), a condizione che i criteri di accettabilità siano soddisfatti. I reagenti di prova vanno selezionati in base alla sensibilità del luminometro utilizzato. Nel caso di un sistema di prova della luciferasi standard, va utilizzato un reagente per lisi cellulare (ad es. Promega, E1531, o equivalente) prima di aggiungere il substrato. Il reagente luciferasi deve essere applicato seguendo le istruzioni fornite dal fabbricante.

ANALISI DEI DATI

Prova sugli agonisti degli ER

34. Nel caso di una prova sugli agonisti degli ER, l'attività trascrizionale relativa al controllo positivo (1 nM di E2) è ottenuta mediante analisi dei segnali luminescenti della medesima piastra conformemente alle seguenti fasi (sono anche accettabili altri processi matematici equivalenti):

Fase 1. Calcolare il valore medio corrispondente al VC.

Fase 2. Sottrarre il valore medio corrispondente al VC dal valore ottenuto per ciascun pozzetto al fine di normalizzare i dati.

Fase 3. Calcolare la media dei valori normalizzati per il PC.

Fase 4. Dividere il valore normalizzato ottenuto per ciascun pozzetto della piastra per la media dei valori normalizzati per il PC (PC = 100 %).

Il valore finale di ciascun pozzetto corrisponde all'attività trascrizionale relativa di tale pozzetto rispetto alla risposta corrispondente al PC.

Fase 5. Calcolare il valore medio dell'attività trascrizionale relativa per ciascun gruppo di concentrazione della sostanza chimica in esame. La risposta comporta due dimensioni: l'attività trascrizionale media (risposta) e la concentrazione che induce tale risposta (cfr. la sezione successiva).

Determinazione delle induzioni EC_{50}, PC_{50} e PC_{10}

35. Il calcolo della EC_{50} si basa su una curva completa concentrazione-risposta, che non è sempre realizzabile o pratica a causa di eventuali limiti dell'intervallo delle concentrazioni di prova (ad esempio, in caso di problemi di citotossicità o di solubilità). Tuttavia, poiché la EC_{50} e il livello massimo di induzione (corrispondente al valore superiore dell'equazione di Hill) sono parametri informativi, essi devono essere indicati ove possibile. Il calcolo della EC_{50} e del livello massimo di induzione si effettua mediante software statistico adeguato (ad es. Graphpad Prism). Se l'equazione logistica di Hill si applica ai dati concentrazione-risposta, la EC_{50} va calcolata mediante la seguente equazione (7):

Y = base + (vertice - base) / (1 + 10 exp ((log EC_{50} - X) x pendenza di Hill)), dove:

X è il logaritmo della concentrazione; e

Y è la risposta, misurata tra la base (*bottom*) e il vertice (*top*) della curva sigmoide. La base è stabilita a zero nell'equazione logistica di Hill.

36. I seguenti dati sono forniti per ciascuna sostanza chimica in esame:

l'RPC_{Max}, che è il livello massimo di risposta indotto dalla sostanza chimica in esame, espresso in percentuale della risposta indotta da 1 nM di E2 sulla stessa piastra, nonché il PC_{Max} (concentrazione corrispondente all'RPC_{Max}); e

per le sostanze chimiche positive, le concentrazioni che corrispondono al PC_{10} e, se del caso, al PC_{50}.

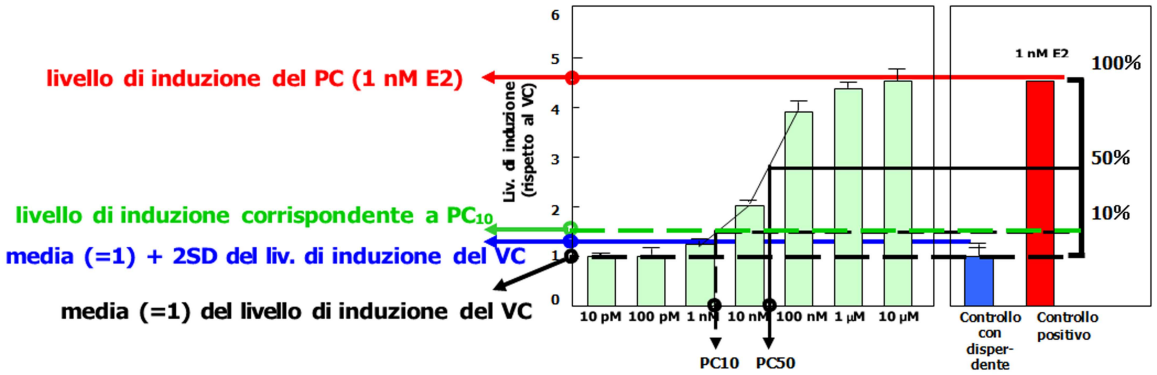
37. Il valore PC_x può essere calcolato mediante interpolazione tra 2 punti della curva X-Y, uno posto immediatamente sopra e l'altro immediatamente sotto al valore PC_x cercato. Quando i punti che si trovano immediatamente al di sopra e al di sotto del valore PC_x hanno, rispettivamente, le coordinate (a,b) e (c,d), il valore PC_x può essere calcolato con la seguente equazione:

$$\log[PC_x] = \log[c]+(x-d)/(d-b)$$

38. La descrizione dei valori relativi al PC è rappresentata nel grafico 1.

Grafico 1

Esempio di deduzione dei valori relativi al PC. Il PC (1 nM di E2) è incluso in ciascuna piastra di prova



Prova sugli antagonisti degli ER

39. Nel caso di una prova sugli antagonisti degli ER, l'attività trascrizionale relativa (RTA) al controllo *spike-in* (25 pM di E2) è ottenuta mediante analisi dei segnali luminescenti della stessa piastra conformemente alle seguenti fasi (sono anche accettabili altri processi matematici equivalenti):

Fase 1. Calcolare il valore medio corrispondente al VC.

Fase 2. Sottrarre il valore medio corrispondente al VC dal valore ottenuto per ciascun pozzetto al fine di normalizzare i dati. Fase 3. Calcolare la media dei valori normalizzati per il controllo *spike-in*.

Fase 4. Dividere il valore normalizzato ottenuto per ciascun pozzetto della piastra per la media dei valori normalizzati per il controllo *spike-in* (controllo *spike-in* = 100 %).

Il valore finale di ciascun pozzetto corrisponde all'attività trascrizionale relativa di tale pozzetto rispetto alla risposta del controllo *spike-in*.

Fase 5. Calcolare il valore medio dell'attività trascrizionale relativa per ciascun gruppo di concentrazione.

Determinazione delle induzioni IC_{30} e IC_{50}

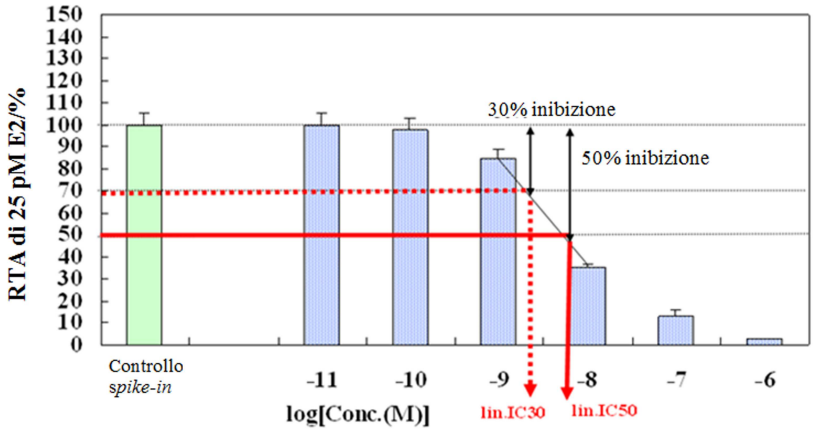
40. Per le sostanze chimiche positive, sono fornite le concentrazioni che corrispondono al valore IC_{30} e, se del caso, all'IC_{50}.

41. Il valore IC_x può essere calcolato mediante interpolazione tra 2 punti della curva X-Y, uno posto immediatamente sopra e l'altro immediatamente sotto al valore IC_x cercato. Quando i punti che si trovano immediatamente al di sopra e al di sotto del valore IC_x hanno, rispettivamente, le coordinate (c,d) e (a,b), il valore IC_x può essere calcolato con la seguente equazione:

lin ICx = a-(b-(100-x)) (a-c) /(b-d)

Grafico 2

Esempio di deduzione dei valori relativi all'IC. Il controllo *spike-in* (25 pM di E2) è incluso in ciascuna piastra di prova



RTA: attività trascrizionale relativa

42. I risultati dovrebbero basarsi su due (o tre) batterie di prove indipendenti. Se due batterie di prove forniscono risultati comparabili e pertanto riproducibili, non è necessario effettuare una terza batteria di prove. Per essere accettabili, i risultati devono:

— soddisfare i criteri di accettabilità (cfr. i criteri di accettabilità, paragrafi da 14 a 20);

— essere riproducibili.

Criteri di interpretazione dei dati

Tabella 7

Criteri di interpretazione dei risultati positivi e negativi per il metodo di prova sugli agonisti degli ER

Positivo	Se il RPC_{Max} ottenuto è pari o superiore al 10 % della risposta del controllo positivo in due batterie di prove su due oppure in almeno due batterie di prove su tre.
Negativo	Se il RPC_{Max} ottenuto rimane inferiore al 10 % della risposta del controllo positivo in due batterie di prove su due oppure in almeno due batterie di prove su tre.

Tabella 8

Criteri di interpretazione dei risultati positivi e negativi per il metodo di prova sugli antagonisti degli ER

Positivo	Se il valore IC_{30} è calcolato in due batterie di prove su due oppure in almeno due batterie di prove su tre.
Negativo	Se non si può calcolare il valore IC_{30} in due batterie di prove su due oppure in almeno due batterie di prove su tre.

43. I criteri di interpretazione dei dati sono indicati nelle tabelle 7 e 8. I risultati positivi saranno caratterizzati sia dall'ordine di grandezza dell'effetto sia dalla concentrazione corrispondente a tale effetto. L'espressione dei risultati sotto forma di concentrazione che induce una risposta pari al 50 % (PC_{50}) o al 10 % (PC_{10}) delle risposte ottenute con il PC nella prova sugli agonisti e un'inibizione del 50 % (IC_{50}) o del 30 % (IC_{30}) del valore del controllo *spike-in* nella prova sugli antagonisti permette di soddisfare entrambi questi obiettivi. Tuttavia, una sostanza chimica in esame è considerata positiva se la risposta massima indotta dalla sostanza chimica in esame (RPC_{Max}) è uguale o superiore al 10 % della risposta del PC in due batterie di prove su due o in almeno due batterie di prove su tre, mentre una sostanza chimica in esame è considerata negativa se la RPC_{Max} non raggiunge almeno il 10 % della risposta del controllo positivo in due batterie di prove su due o in almeno due batterie di prove su tre.

44. I valori di PC_{10}, PC_{50} e PC_{Max} nella prova sugli agonisti degli ER e di IC_{30} e IC_{50} nella prova sugli antagonisti degli ER possono essere ottenuti mediante un foglio di calcolo disponibile con la Linea guida sul sito internet pubblico dell'OCSE ([1]).

45. Due prove ripetute dovrebbero essere sufficienti per determinare i valori PC_{10} o PC_{50} e IC_{30} o IC_{50}. Tuttavia, se il livello di riferimento dei dati nello stesso intervallo di concentrazioni mostra un coefficiente di variazione (VC; %) inaccettabilmente elevato, i dati possono essere considerati non affidabili e occorre individuare la fonte dell'elevata variabilità. Il VC dei dati grezzi triplicati (ossia i dati sull'intensità della luminescenza) corrispondenti ai punti di dati utilizzati per il calcolo del PC_{10} deve essere inferiore al 20 %.

46. Il rispetto dei criteri di accettabilità indica che il sistema di prova funziona correttamente, ma non garantisce che qualsiasi prova produrrà dati accurati. Duplicare i risultati della prima batteria di prove è la migliore garanzia che i dati generati sono corretti.

47. Nel caso della prova sugli agonisti degli ER, quando sono necessarie informazioni supplementari in aggiunta alle finalità di screening e di definizione delle priorità della presente linea guida concernente le sostanze chimiche in esame positive, in particolare le sostanze chimiche che vanno da PC_{10} a PC_{49}, così come le sostanze chimiche di cui si sospetta che inducano una sovrastimolazione della luciferasi, una conferma che l'attività luciferasi osservata è dovuta esclusivamente alla risposta mediata da ERα può essere ottenuta utilizzando un antagonista ERα (cfr. l'appendice 2.1).

RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DELLA PROVA

48. Cfr. il paragrafo 20 della sezione "ELEMENTI DEL METODO DI PROVA DEL METODO ER TA").

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1 459-1 469.

(3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.,* 139, 4 252-4 263.

([1]) http://www.oecd.org/env/testguidelines

(4) Spaepen M., *et al*. (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, FEMS Microbiol. Lett., 78(1), 89-94.

(5) Kobayashi H., *et al*. (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, J. Vet. Med. Sci., 57(4), 769- 71.

(6) Dussurget O. and Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl*. Environ. *Microbiol*., 60(3), 953-9.

(7) De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, Am. J. *Physiol*., 235, E97-El02.

Appendice 2.1

FALSI POSITIVI: VALUTAZIONE DEI SEGNALI DI LUMINESCENZA NON MEDIATI DAI RECETTORI

1. I falsi positivi nella prova sugli agonisti degli ER possono essere generati dall'attivazione del gene luciferasi non mediata da ER, o dall'attivazione diretta di un prodotto del gene o da una fluorescenza la cui origine è indeterminata. Tali effetti sono segnalati da una curva dose-risposta incompleta o insolita. Se tali effetti sono sospetti, va esaminato l'effetto di un antagonista dell'ER (ad esempio, 4-idrossitamoxifene [OHT] a una concentrazione non tossica) sulla risposta. L'antagonista puro ICI 1827 80 potrebbe non essere adatto a questo scopo perché una concentrazione sufficiente di ICI 1827 80 può diminuire il valore corrispondente al VC, alterando l'analisi dei dati.

2. Per garantire la validità di questo approccio occorre testare nella stessa piastra gli elementi seguenti:

   — attività agonista della sostanza chimica sconosciuta in presenza / in assenza di 10 μM di OHT;

   — VC (in triplicato);

   — OHT (in triplicato);

   — 1 nM di E2 (in triplicato) come controllo positivo agonista;

   — 1 nM di E2 + OHT (in triplicato).

Criteri di interpretazione dei dati

Nota: tutti i pozzetti devono contenere la stessa concentrazione di mezzo disperdente.

— Se l'attività agonista della sostanza chimica sconosciuta NON è modificata dal trattamento con l'antagonista degli ER, il risultato è considerato «negativo».

— Se l'attività agonista della sostanza chimica sconosciuta è completamente inibita, si applicano i criteri di interpretazione.

— Se l'attività agonista alla concentrazione più bassa è pari o superiore alla risposta del PC_{10}, la sostanza sconosciuta è inibita in misura uguale o superiore alla risposta del PC_{10}. Calcolare la differenza tra le risposte relative ai pozzetti che hanno ricevuto l'antagonista degli ER e quelli che non l'hanno ricevuto; tale differenza è quindi considerata la vera risposta e va utilizzata per il calcolo dei parametri appropriati per consentire una decisione sulla classificazione della sostanza chimica.

Analisi dei dati

Verificare lo standard di prestazione.

Verificare il VC tra i pozzetti trattati alle medesime condizioni.

1. Calcolare il valore medio corrispondente al VC;

2. sottrarre il valore medio del VC dal valore ottenuto per ciascun pozzetto **non** trattato con OHT;

3. calcolare il valore medio corrispondente a OHT;

4. sottrarre il valore medio del VC dal valore ottenuto per ciascun pozzetto trattato con OHT;

5. calcolare il valore medio ottenuto con il controllo positivo;

6. calcolare l'attività trascrizionale relativa di tutti gli altri pozzetti rispetto al controllo positivo.

Appendice 2.2

PREPARAZIONE DEL SIERO TRATTATO CON CARBONE RIVESTITO DI DESTRANO (DCC)

1. Il trattamento del siero con il carbone rivestito di destrano (DCC) è un metodo generico per eliminare i composti estrogenici dal siero aggiunto al terreno di coltura cellulare, al fine di escludere dalla risposta qualsiasi distorsione (*bias*) causata da residui estrogenici nel siero. Questa procedura consente di trattare 500 ml di siero fetale bovino (FBS).

Componenti

2. Sono necessari i seguenti materiali e attrezzature:

Materiali

Carbone attivo

Destrano

Cloruro di magnesio esaidrato ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)

Saccarosio

1 M di soluzione tampone HEPES (pH 7,4)

Acqua ultra pura ottenuta per filtrazione

Attrezzature

Recipiente di vetro sterilizzato in autoclave (le dimensioni devono essere adattate alle necessità) Centrifuga classica da laboratorio (con temperatura regolabile a 4 °C)

Procedura

3. La seguente procedura è adeguata per l'uso di provette per centrifuga da 50 ml:

[Giorno 1] Preparare una sospensione di carbone-destrano in 1 litro di acqua ultra pura contenente 1,5 mM di $MgCl_2$, 0,25 M di saccarosio, 2,5 g di carbone, 0,25 g di destrano e 5 mM di HEPES e agitare alla temperatura di 4 °C tutta la notte.

[Giorno 2] Distribuire la sospensione nelle provette per centrifuga da 50 ml e centrifugare a 10 000 giri al minuto a 4 °C per 10 minuti. Rimuovere il supernatante e mettere da parte la metà del sedimento di carbone a 4 °C per utilizzarlo il Giorno 3. Sospendere l'altra metà del carbone con FBS che sarà stato scongelato lentamente per evitare la formazione di precipitato, quindi inattivarla termicamente a 56 °C per 30 minuti e trasferirla in un recipiente di vetro sterilizzato in autoclave, ad esempio un matraccio di Erlenmeyer. Agitare la sospensione moderatamente a 4 °C, per tutta la notte.

[Giorno 3] Distribuire la sospensione con FBS nelle provette per centrifuga da 50 ml e centrifugare a 10 000 giri al minuto a 4 °C per 10 minuti. Raccogliere il FBS e trasferirlo nel nuovo sedimento di carbone che è stato preparato e conservato il Giorno 2. Disperdere il sedimento di carbone nel FBS ed agitare delicatamente la sospensione in un recipiente in vetro sterilizzato, alla temperatura di 4 °C, per tutta la notte.

[Giorno 4] Distribuire la sospensione per una centrifugazione a 10 000 giri al minuto a 4 °C per 10 minuti; sterilizzare il supernatante per filtrazione con filtro sterile di 0,2 µm. Questo FBS trattato al DCC è conservato a −20 °C e può essere utilizzato per un anno al massimo.

Appendice 3

METODO DI PROVA DI TRANSATTIVAZIONE CHE UTILIZZA IL RECETTORE ESTROGENICO VM7LUC PER INDIVIDUARE GLI AGONISTI E GLI ANTAGONISTI DEGLI ER

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI (CFR. ANCHE INTRODUZIONE GENERALE)

1. Il presente metodo di prova utilizza la linea cellulare VM7Lu4E2 ([1]). È stato validato dal *National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods* (NICEATM) e dal comitato di coordinamento inter-agenzie per la validazione dei metodi alternativi (ICCVAM) (1). Le linee cellulari VM7Luc esprimono, in modo endogeno, prevalentemente gli ERα e una minima quantità di ERβ (2) (3) (4).

2. Il presente metodo di prova è applicabile a una vasta gamma di sostanze, a condizione che possano essere disciolte in dimetilsulfossido (DMSO; CASRN 67-68-5), non reagiscano con il DMSO né con il terreno di coltura cellulare e non siano citotossiche alle concentrazioni testate. Se non è possibile utilizzare il DMSO, si può usare un altro mezzo disperdente, come l'etanolo o l'acqua (cfr. il paragrafo 12). Le dimostrazioni del funzionamento del metodo di prova del VM7 Luc ER TA sugli (ant)agonisti indicano che i dati generati possono fornire informazioni sui meccanismi d'azione mediati dagli ER e possono essere presi in considerazione per determinare quali sostanze sottoporre a ulteriori prove in via prioritaria.

3. Il presente metodo di prova è concepito in modo specifico per individuare la transattivazione mediata da hERαα e hERßß utilizzando la chemiluminescenza come endpoint. I bio-saggi utilizzano diffusamente la chemiluminescenza, poiché la luminescenza ha un elevato rapporto segnale/rumore di fondo. Tuttavia, l'attività della luciferasi di lucciola può essere perturbata dalle sostanze che inibiscono l'enzima luciferasi, il che provoca un'inibizione manifesta o un aumento della luminescenza dovuta alla stabilizzazione della proteina. Inoltre, in alcune prove che utilizzano il gene reporter luciferasi attivato dagli ER, sono stati osservati segnali di luminescenza non mediati dai recettori per concentrazioni di fitoestrogeni superiori a 1 μM, a motivo della sovrattivazione del gene reporter della luciferasi (9) (11). Mentre la curva dose-risposta indica che la reale attivazione del sistema ER avviene a concentrazioni inferiori, l'espressione della luciferasi ottenuta a concentrazioni elevate di fitoestrogeni o di composti simili sospettati di indurre una sovrattivazione del gene reporter della luciferasi mediante un meccanismo analogo a quello dei fitoestrogeni deve essere esaminata con attenzione nei sistemi di prova di ER TA trasfettati in modo stabile.

4. Le sezioni "INTRODUZIONE GENERALE" e "COMPONENTI DEL METODO DI PROVA ER TA" vanno lette prima di applicare il presente metodo di prova per fini regolamentari. Le definizioni e le abbreviazioni utilizzate nel presente metodo di prova figurano nell'appendice 1.

PRINCIPIO DEL METODO DI PROVA (CFR. ANCHE INTRODUZIONE GENERALE)

5. Il metodo di prova serve ad indicare la formazione di un legame tra l'ER e il ligando, seguita dalla traslocazione del complesso recettore-ligando costituito verso il nucleo. Nel nucleo, il complesso recettore-ligando si lega a specifici elementi di risposta del DNA e transattiva il gene reporter (*luc*), che induce la produzione della luciferasi e la successiva emissione luminosa, che può essere quantificata con un luminometro. L'attività della luciferasi può essere valutata in modo rapido e poco costoso grazie ai numerosi kit di analisi disponibili in commercio. Il metodo di prova VM7Luc ER TA utilizza una linea cellulare resistente di adenocarcinoma del seno di origine umana che esprime gli ER, che è stata trasfettata in modo stabile con un costrutto del gene reporter della luciferasi di lucciola (*luc*) regolata da quattro elementi di risposta agli estrogeni inseriti a monte del promotore del virus delle neoplasie

([1]) Prima del giugno 2016 questa linea cellulare era nominata BG1Luc. Le cellule BG-1 sono state originariamente descritte da *Geisinger et al.* (1998) (12) e ulteriormente caratterizzate dai ricercatori del *National Institute of Environmental Health Sciences* (NIEHS) (13). Relativamente di recente è emerso che esistono due diverse varianti delle cellule BG-1 utilizzate dai ricercatori: BG-1 Fr e BG-1 NIEHS. Un'analisi approfondita, che includeva test sul DNA, di queste due varianti di linee cellulari BG-1, effettuata da Li *et al.* (2014) (14), ha dimostrato che BG-1 Fr era unica e che BG-1 NIEHS, ossia la linea cellulare originaria utilizzata per sviluppare la prova, non era la linea cellulare BG1 del carcinoma ovarico di origine umana, bensì una variante della linea cellulare MCF7 del cancro al seno di origine umana. La linea cellulare utilizzata nel metodo di prova, inizialmente indicata come BG1Lu4E2 (15), sarà ora designata VM7Lu4E2 («V» = variante; «M7» = cellule MCF7). Analogamente, la prova verrà ora designata VM7Luc ER TA. Sebbene cambi l'origine della linea cellulare su cui si basa la prova, ciò non pregiudica gli studi di validazione pubblicati né l'utilità e l'applicazione della presente prova a fini di screening delle sostanze chimiche estrogeniche/anti-estrogeniche.

mammarie (MMTV) dei topi, al fine di individuare le sostanze che presentano un'attività estrogenica agonista o antagonista *in vitro*. Il promotore del MMTV mostra soltanto una debole reattività incrociata con altri ormoni steroidei e non steroidei (8). I criteri d'interpretazione dei dati sono descritti in dettaglio al paragrafo 41. In sintesi, una risposta positiva è caratterizzata da una curva concentrazione-risposta contenente almeno tre punti le cui barre di errore (media ± SD) non si sovrappongono, nonché da una variazione dell'ampiezza (unità di luce relativa normalizzata [RLU]) pari ad almeno il 20 % del valore massimo dello standard di riferimento (17β-estradiolo [E2; n. CAS 50-28-2] per la prova sugli agonisti, raloxifene HCl [Ral; n. CAS 84 449-90-1]/E2 per la prova sugli antagonisti).

PROCEDURA

Linea cellulare

6. Per il presente metodo di prova si utilizza la linea cellulare VM7Luc4E2 trasfettata in modo stabile. Questa linea cellulare può essere ottenuta soltanto mediante sottoscrizione di un accordo di licenza tecnica rilasciato dall'Università di California, Davis, California, USA ([2]), e da Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, North Carolina, Stati Uniti ([3]).

Stabilità della linea cellulare

7. Per preservare la stabilità e l'integrità della linea cellulare, le cellule coltivate sono sottoposte a più di un passaggio tra lo stock congelato e il mezzo di conservazione (cfr. il paragrafo 9). Le cellule non sono più coltivate oltre i 30 passaggi. Per la linea cellulare VM7Lu4E2, ci vorranno circa tre mesi per effettuare 30 passaggi.

Condizioni di coltura e di piastratura delle cellule

8. Per garantire la qualità di tutti i materiali e metodi e mantenere l'integrità, la validità e la riproducibilità delle prove effettuate, occorre seguire le procedure indicate nel documento *Guidance on Good Cell Culture Pract* (5) (6).

9. Le cellule VM7Lu4E2 sono conservate nel mezzo RPMI 1 640 integrato con 0,9 % di Pen-Strep e 8,0 % di siero fetale bovino (FBS) in un apposito incubatore per la coltura tessutale a 37 °C ± 1 °C, con un'umidità di 90 % ± 5 % e un'atmosfera contenente 5,0 % ± 1 % di CO_2.

10. Quando la confluenza raggiunge ~ 80 %, le cellule VM7Lu4E2 sono replicate e condizionate in un mezzo senza estrogeni per 48 ore. Esse sono disposte su piastre da 96 pozzetti per essere esposte alle sostanze chimiche in esame e per l'analisi dell'induzione estrogena dipendente dall'attività della luciferasi. Il mezzo senza estrogeni (EFM) contiene il mezzo di Eagle modificato da Dulbecco (DMEM) senza rosso fenolo, integrato da 4,5 % di FBS trattato con carbone-destrano, 1,9 % di L-glutammina e 0,9 % di Pen-Strep. Tutti i materiali in plastica devono essere esenti da attività estrogeniche [cfr. il protocollo dettagliato (7)].

Criteri di accettabilità

11. L'accettazione o il rigetto di una prova si basa sulla valutazione dei risultati ottenuti con gli standard di riferimento e i controlli di ciascun esperimento condotto su una piastra a 96 pozzetti. Ciascuno standard di riferimento è testato a diverse concentrazioni e la prova prevede multiple repliche di ciascuna concentrazione di riferimento e di controllo. I

([2]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, E: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649.

([3]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, email: info@dioxins.com, Telephone: 919-688-4804, Fax: 919-688-4404.

risultati sono quindi confrontati con i controlli di qualità (QC) per questi parametri, che sono derivati dalle basi di dati storici per gli effetti agonisti e antagonisti generati da ciascun laboratorio durante la dimostrazione del livello di competenza. Le basi di dati storiche sono costantemente aggiornate con i valori degli standard di riferimento e dei controlli. Qualsiasi cambiamento nell'attrezzatura o nelle condizioni di laboratorio può richiedere lo sviluppo di basi di dati storiche aggiornate.

Prova dell'effetto agonista

Prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni (prova di *range finding)*

- Induzione: si misura l'effetto indotto sulla piastra dividendo il valore medio delle unità relative di luce (RLU) massime ottenute con lo standard di riferimento E2 per il valore medio di RLU del controllo DMSO. Si osserva generalmente un'induzione moltiplicata per cinque, ma ai fini dell'accettazione della prova l'induzione deve essere uguale o superiore a quattro volte.

- Risultati del controllo DMSO: i valori di RLU del controllo con solvente devono situarsi entro 2,5 volte la deviazione standard del valore medio storico delle RLU del controllo con solvente.

- Se uno di questi criteri non è soddisfatto, l'esperimento deve essere invalidato e ripetuto.

Prova completa

La prova è soggetta ai medesimi criteri di accettabilità applicabili alla prova di determinazione dell'intervallo di concentrazioni per gli effetti agonisti, ai quali si aggiungono:

- i risultati dello standard di riferimento: la curva concentrazione-risposta dello standard di riferimento E2 corrisponde a un sigmoide e comporta almeno tre valori nella porzione lineare di detta curva.

- i risultati del controllo positivo: i valori di RLU del controllo metossicloro devono essere superiori alla media di DMSO più tre volte la deviazione standard di tale media.

- Se uno qualsiasi di questi criteri non è soddisfatto, l'esperimento deve essere invalidato e ripetuto.

Prova dell'effetto antagonista

Prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni (prova di *range finding)*

- Inibizione: si misura l'effetto inibitorio sulla piastra dividendo il valore medio delle unità relative di luce (RLU) massime ottenute con lo standard di riferimento Ral/E2 per il valore medio di RLU del controllo DMSO. Si osserva generalmente un'inibizione moltiplicata pari a cinque volte il valore del controllo, ma ai fini dell'accettazione della prova l'inibizione deve essere uguale o superiore a tre volte.

- risultati del controllo E2: i valori di RLU del controllo E2 devono situarsi entro 2,5 volte la deviazione standard del valore medio storico delle RLU del controllo E2.

- Risultati del controllo DMSO: i valori di RLU del controllo DMSO devono situarsi entro 2,5 volte la deviazione standard del valore medio storico delle RLU del controllo con solvente.

• Se uno qualsiasi di questi criteri non è soddisfatto, l'esperimento deve essere invalidato e ripetuto.

Prova completa

La prova è soggetta ai medesimi criteri di accettabilità applicabili alla prova di definizione dell'intervallo per gli effetti antagonisti, ai quali si aggiungono:

• i risultati dello standard di riferimento: la curva concentrazione-risposta dello standard di riferimento Ral/E2 corrisponde a un sigmoide e comporta almeno tre valori nella porzione lineare di detta curva.

• i risultati del controllo positivo: i valori di RLU del controllo tamoxifene/E2 devono essere inferiori alla media del controllo E2 meno tre volte la deviazione standard di tale media.

• Se uno qualsiasi di questi criteri non è soddisfatto, l'esperimento deve essere invalidato e ripetuto.

Standard di riferimento, controlli positivi e controlli con mezzo disperdente

Controllo con mezzo disperdente (prove per l'effetto agonista e antagonista)

12. Il mezzo disperdente usato per sciogliere le sostanze chimiche in esame deve essere testato come controllo con mezzo disperdente. Il mezzo disperdente utilizzato durante la validazione della prova VM7Luc ER TA era l'1 % (v/v) di dimetilsolfossido (DMSO, n. CAS 67-68-5) (cfr. il paragrafo 24). Se si usa un mezzo disperdente diverso dal DMSO, tutti gli standard di riferimento, i controlli e le sostanze chimiche in esame devono, se del caso, essere testati nel medesimo mezzo disperdente.

Standard di riferimento (Range finding per l'effetto agonista)

13. Lo standard di riferimento è l'E2 (n. CAS 50-28-2). Per la prova di range finding, lo standard di riferimento E2 è sottoposto a una serie di 4 diluizioni (1,84 x 10^{-10}, 4,59 x 10^{-11}, 1,15 x 10^{-11} e 2,87 x 10^{-12} M), con ciascuna concentrazione testata in due pozzetti.

Standard di riferimento (prova completa per l'effetto agonista)

14. L'E2 per la prova completa è soggetto a una serie di diluizioni successive di 1:2 fino a ottenere 11 concentrazioni (che vanno da 3,67 x 10^{-10} a 3,59 x 10^{-13} M), con ciascuna concentrazione testata in due pozzetti.

Standard di riferimento (Range finding per l'effetto antagonista)

15. Lo standard di riferimento è una combinazione di Ral (n. CAS 84 449-90-1) e E2 (n. CAS 50-28-2). Per la prova di *range finding*, la miscela Ral/E2 è sottoposta a una serie di diluizioni fino a ottenere tre concentrazioni di Ral (3,06 x 10^{-9}, 7,67 x 10^{-10}, e 1,92 x 10^{-10}M) più una concentrazione costante di E2 (9,18 × 10^{-11} M) con ciascuna diluizione testata in due pozzetti.

Standard di riferimento (prova completa per l'effetto antagonista)

16. Per la prova completa, la miscela Ral/E2 è sottoposta a una serie di diluizioni successive di 1:2 di Ral (che vanno da 2,45x 10^{-8} a 9,57 x 10^{-11}M) più una concentrazione costante di E2 (9,18 × 10^{-11} M) per ottenere nove concentrazioni di Ral/E2, ciascuna testata in due pozzetti.

Controllo debolmente positivo (agonista)

17. Il controllo debolmente positivo debole è una soluzione di 9,06 x 10^{-6} M *p,p'*-metossicloro (metossicloro; n. CAS 72-43-5) in EFM.

Controllo debolmente positivo (antagonista)

18. Il controllo debolmente positivo è una soluzione di tamoxifene (n. CAS 10 540-29-1) a 3,36 x 10^{-6} M e di E2 a 9,18 × 10^{-11} M in EFM.

Controllo E2 (solo prova dell'effetto antagonista)

19. Il controllo E2 è una soluzione di 9,18 × 10^{-11} M in EFM ed è usato come controllo negativo di riferimento.

Aumento dell'induzione (effetto agonista)

20. L'induzione dell'attività della luciferasi nello standard di riferimento (E2) è misurata dividendo il valore medio di RLU più elevate ottenute per l'E2 con il valore medio di RLU corrispondente al controllo di DMSO; il risultato deve essere almeno quattro volte maggiore.

Aumento dell'inibizione (effetto antagonista)

21. L'inibizione media dell'attività della luciferasi osservata nello standard di riferimento (Ral/E2) è misurata dividendo il valore medio di RLU più elevate ottenute per la miscela Ral/E2 con il valore medio di RLU corrispondente al controllo di DMSO; il risultato deve essere almeno tre volte maggiore.

Dimostrazione della competenza del laboratorio (cfr. il paragrafo 14 e le tabelle 3 e 4 nei « COMPONENTI DEL METODO DI PROVA ER TA» di questo metodo di prova).

Mezzo disperdente

22. Le sostanze chimiche in esame vanno disciolte in un solvente capace di solubilizzare la sostanza chimica in esame e miscibile con il mezzo di coltura cellulare. L'acqua, l'etanolo (purezza tra il 95 % e il 100 %) e il DMSO sono mezzi disperdenti idonei. Se si usa il DMSO, il livello non deve superare l'1 % (v/v). Per ogni mezzo disperdente va dimostrato che il volume massimo utilizzato non è citotossico e non interferisce con le prestazioni del metodo di prova. Gli standard di riferimento e i controlli sono disciolti in un solvente del 100 % e poi diluiti fino a raggiungere le opportune concentrazioni in EFM.

Preparazione delle sostanze chimiche in esame

23. Le sostanze chimiche in esame sono disciolte in 100 % di DMSO (o solvente idoneo) e poi diluite fino a raggiungere le opportune concentrazioni in EFM. Prima di essere disciolte e diluite, tutte le sostanze chimiche in esame sono portate a temperatura ambiente. Per ciascuna prova vanno preparate fresche soluzioni della sostanza chimica in esame. Non devono presentare né precipitato visibile né intorbidimento. Le soluzioni primarie degli standard di riferimento e dei controlli possono essere preparati in anticipo; ma le soluzioni e le diluizioni finali dello standard di riferimento, dei controlli e delle sostanze chimiche in esame devono essere preparate e utilizzate entro 24 ore prima di ciascuna prova.

Solubilità e citotossicità: Considerazioni ai fini della determinazione preliminare delle concentrazioni

24. La prova preliminare di range finding consiste in sette diluizioni successive di rapporto 1:10 in duplicato. Inizialmente le sostanze chimiche in esame sono testate fino alla concentrazione massima di 1 mg/ml (~ 1 mM) per le prove per l'effetto agonista e 20 µg/ml (~ 10µ M) per le prove per l'effetto antagonista. Le prove di range finding permettono di determinare quanto segue:

— le concentrazioni di partenza della sostanza chimica in esame da utilizzare durante le prove complete;

— le diluizioni della sostanza chimica in esame da utilizzare durante le prove complete.

25. La valutazione della vitalità/citotossicità cellulare è inclusa nei protocolli di prova per l'effetto agonista e antagonista (7), sia nelle prove di range finding sia nelle prove complete. La prova di citotossicità utilizzata per valutare la vitalità cellulare durante la validazione del metodo VM7Luc ER TA (1) era fondato su un metodo di osservazione visiva qualitativa per gradi; ma può essere utilizzato un metodo quantitativo per il medesimo scopo (cfr. il protocollo (7)). I dati relativi alle concentrazioni della sostanza chimica in esame che causano una riduzione della vitalità cellulare superiore al 20 % non possono essere utilizzati.

Esposizione alla sostanza chimica in esame e configurazione della piastra di prova

26. Le cellule sono contate e depositate in piastre di coltura tessutale a 96 pozzetti (2×10^5 cellule per pozzetto) in EFM e incubate per 24 ore in modo da consentire alle cellule di aderire alla piastra. L'EFM è quindi eliminato e sostituito con le soluzioni di sostanze di riferimento e di sostanze chimiche in esame in EFM e la piastra è incubata per 19-24 ore. Particolare considerazione deve essere prestata alle sostanze altamente volatili in quanto possono generare falsi positivi quando si trovano accanto a pozzetti contenenti un controllo. In tali casi, si raccomanda l'utilizzo di dispositivi di chiusura «ermetica» per le piastre in modo da isolare efficacemente i singoli pozzetti durante la sperimentazione.

Prove di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni (range finding)

27. Per le prove di range finding si utilizzano tutti i pozzetti della piastra a 96 pozzetti per testare fino a sei sostanze chimiche in esame in sette concentrazioni diverse ottenute con diluizioni successive in rapporto 1:10, valutate in duplicato (cfr. Grafici 1 e 2).

— La prova di range finding per l'effetto *agonista* utilizza quattro concentrazioni di E2 in duplicato come standard di riferimento e quattro repliche del controllo DMSO.

— La prova di range finding per l'effetto *antagonista* utilizza tre concentrazioni della miscela Ral/E2 (in cui l'E2 rimane costante a $9{,}18 \times 10^{-11}$ M) in duplicato, come standard di riferimento, e tre pozzetti assegnati rispettivamente ai controlli con E2 e DMSO.

Figura 1

Configurazione della piastra a 96 pozzetti per la prova di *range finding* per l'effetto agonista

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Abbreviazioni: da E2-1 a E2-4 = concentrazioni dello standard di riferimento E2 (in ordine decrescente); da TC1-1 a TC1-7 = concentrazioni (in ordine decrescente) della sostanza chimica in esame 1 (TC1); da TC2-1 a TC2-7 = concentrazioni (in ordine decrescente) della sostanza chimica in esame 2 (TC2); da TC3-1 a TC3-7 = concentrazioni (in ordine decrescente) della sostanza chimica in esame 3 (TC3); da TC4-1 a TC4-7 = concentrazioni (in ordine decrescente) della sostanza chimica in esame 4 (TC4); da TC5-1 a TC5-7 = concentrazioni (in ordine decrescente) della sostanza chimica in esame 5 (TC5); da TC6-1 a TC6-7 = concentrazioni (in ordine decrescente) della sostanza chimica in esame 6 (TC6); VC = controllo con mezzo disperdente (DMSO a 1 % v/v EFM).

Figura 2

Configurazione della piastra a 96 pozzetti per la prova di *range finding* per l'effetto antagonista

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Abbreviazioni: E2 = controllo E2; da Ral-1 a Ral-3 = concentrazioni dello standard di riferimento Raloxifene/E2 (in ordine decrescente); da TC1-1 a TC1-7 = concentrazioni (in ordine decrescente) della sostanza chimica in esame 1 (TC1); da TC2-1 a TC2-7 = concentrazioni (in ordine decrescente) della sostanza chimica in esame 2 (TC2); da TC3-1 a TC3-7 = concentrazioni (in ordine decrescente) della sostanza chimica in esame 3 (TC3); da TC4-1 a TC4-7 = concentrazioni (in ordine decrescente) della sostanza chimica in esame 4 (TC4); da TC5-1 a TC5-7 = concentrazioni (in ordine decrescente) della sostanza chimica in esame 5 (TC5); da TC6-1 a TC6-7 = concentrazioni (in ordine decrescente) della sostanza chimica in esame 6 (TC6); VC = controllo con mezzo disperdente (DMSO a 1 % v/v EFM).

Nota: Tutte le sostanze chimiche in esame sono sottoposte a prova in presenza di $9{,}18 \times 10^{-11}$ M di E2.28. Il volume finale di mezzo raccomandato in ciascun pozzetto è di 200 µl. Utilizzare solo piastre di prova in cui le cellule in tutti i pozzetti diano una vitalità pari o superiore all'80 %.

29. La determinazione delle concentrazioni iniziali per le prove complete per l'effetto ***agonista***è descritta dettagliatamente nel protocollo relativo a tale effetto (7). In sintesi, si utilizzano i seguenti criteri:

— Se non vi sono punti sulla curva di concentrazione della sostanza chimica in esame che sono superiori al valore medio del controllo del DMSO più tre volte la sua deviazione standard, la prova completa va eseguita con una serie di 11 diluizioni successive con rapporto 1:2, a partire dalla concentrazione di saturazione della sostanza chimica in esame.

— Se vi sono punti sulla curva di concentrazione della sostanza chimica in esame che sono superiori al valore medio del controllo DMSO più tre volte la sua deviazione standard, la prova completa utilizza una serie di 11 diluizioni successive a partire da una concentrazione superiore di 1 log alla concentrazione che induce le RLU adattate più elevate nella prova di *range finding*. Tale serie di 11 diluizioni è effettuata in base a rapporti di diluizione 1:2 o 1:5 in funzione dei seguenti criteri:

si raccomanda di utilizzare una serie di diluizioni con rapporto 1:2 se la gamma di concentrazioni risultante permette di osservare l'insieme delle risposte previste sulla base della curva concentrazione-risposta ottenuta nella prova di *range finding*. Altrimenti utilizzare una diluizione con rapporto 1:5.

— Se una sostanza chimica in esame presenta una curva di concentrazione-risposta bifasica nella prova di range finding, entrambe le fasi vanno studiate nella prova completa.

30. La determinazione delle concentrazioni iniziali per le prove complete per l'effetto ***antagonista*** è descritta dettagliatamente nel protocollo relativo a tale effetto (7). In sintesi, si utilizzano i seguenti criteri:

— Se non vi sono punti sulla curva di concentrazione della sostanza chimica in esame che sono inferiori al valore medio del controllo di E2 meno tre volte la sua deviazione standard, la prova completa va eseguita con una serie di 11 diluizioni successive con rapporto 1:2, a partire dalla concentrazione di saturazione della sostanza chimica in esame.

— Se vi sono punti sulla curva di concentrazione della sostanza chimica in esame che sono inferiori al valore medio del controllo di E2 meno tre volte la sua deviazione standard, la prova completa utilizza una serie di 11 diluizioni successive a partire da una delle concentrazioni seguenti:

• la concentrazione che dà il valore più basso (di RLU adattate) nella prova di *range finding*;

• la concentrazione massima solubile (cfr. protocollo per l'effetto antagonista (7), grafico 14-2);

• la concentrazione minima che induce un effetto citotossico (cfr. protocollo per l'effetto antagonista (7), grafico 14-3 per un esempio in materia);

— Tale serie di 11 diluizioni è effettuata in base a rapporti di diluizione 1:2 o 1:5 in funzione dei seguenti criteri:

si raccomanda di utilizzare una serie di diluizioni con rapporto 1:2 se la gamma di concentrazioni risultante permette di osservare l'insieme delle risposte previste sulla base della curva concentrazione-risposta ottenuta nella prova di *range finding*. Altrimenti usare una diluizione 1:5.

Prove complete

31. Le prove complete consistono in una serie di 11 diluizioni successive (con rapporto 1:2 o 1:5 in funzione della concentrazione iniziale selezionata in base ai criteri pertinenti), con ciascuna concentrazione testata in tre pozzetti della piastra a 96 pozzetti (cfr. Figure 3 e 4).

— La prova completa per l'effetto *agonista* utilizza 11 concentrazioni di E2 in duplicato come standard di riferimento. Su ciascuna piastra, quattro pozzetti sono utilizzati come repliche per il controllo di DMSO e quattro pozzetti per il controllo metossicloro (9,06 x 10^{-6} M).

— La prova di *range finding* per l'effetto *antagonista* utilizza nove concentrazioni della miscela Ral/E2 in duplicato, come standard di riferimento, quattro repliche del controllo di E2 a 9,18 x 10^{-11} M, quattro repliche del controllo DMSO e quattro repliche del tamoxifene a 3.36 x 10^{-6}M.

Figura 3

Configurazione della piastra a 96 pozzetti per la prova completa per l'effetto agonista

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

Abbreviazioni: da TC1-1 a TC1-11 = concentrazioni (in ordine decrescente) della sostanza chimica in esame 1; da TC2-1 a TC2-11 = concentrazioni (in ordine decrescente) della sostanza chimica in esame 2; da E2-1 a E2-11 = concentrazioni dello standard di riferimento E2 (in ordine decrescente); Meth = controllo debolmente positivo *p, p'*-metossicloro; VC = controllo con mezzo disperdente DMSO (1 % v/v) in EFM

Figura 4

Configurazione della piastra a 96 pozzetti per la prova completa per l'effetto antagonista

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Abbreviazioni: E2 = controllo E2; da Ral-1 a Ral-9 = concentrazioni dello standard di riferimento Raloxifene/E2 (in ordine decrescente); Tam = controllo debolmente positivo Tamoxifene/E2; da TC1-1 a TC1-11 = concentrazioni (in ordine decrescente) della sostanza chimica in esame 1 (TC1); da TC2-1 a TC2-11 = concentrazioni (in ordine decrescente) della sostanza chimica in esame 2 (TC2); VC = controllo con mezzo disperdente (DMSO a 1 % v/v EFM).

Nota: Come osservato, tutti i pozzetti contenenti lo standard di riferimento e la sostanza chimica in esame mostrano la medesima concentrazione di E2 (9,18 x 10^{-11} M)32.

Per garantire l'indipendenza dei risultati occorre ripetere le prove complete per la stessa sostanza chimica in giorni diversi. È opportuno svolgere almeno due prove complete. Se i risultati delle prove si contraddicono (ad esempio, una delle prove è positiva, l'altra negativa), oppure se una delle prove è inadeguata, va effettuata una terza prova supplementare.

Misurazione della luminescenza

33. La luminescenza è misurata nell'intervallo da 300 a 650 nm, mediante un luminometro dotato di un sistema di iniezione e un software che controlla il volume di iniezione e l'intervallo di misurazione (7). L'emissione luminosa osservata per ciascun pozzetto è espressa come RLU per pozzetto.

ANALISI DEI DATI

Determinazione della EC_{50} e della IC_{50}

34. Il valore EC_{50} (concentrazione della sostanza chimica in esame corrispondente alla metà della risposta massima [effetto agonista]) e il valore IC_{50} (concentrazione della sostanza chimica in esame corrispondente alla metà dell'inibizione massima [effetto antagonista]) sono determinati a partire dai dati della curva concentrazione-risposta. Per le sostanze chimiche in esame positive a una o più concentrazioni, la concentrazione della sostanza chimica in esame che provoca la metà della risposta massima (IC_{50} o EC_{50}) è calcolata utilizzando una funzione di Hill o un altro metodo appropriato. La funzione di Hill è un modello matematico logistico a quattro parametri che associa la concentrazione della sostanza chimica in esame a una risposta (solitamente secondo una funzione sigmoide), utilizzando la seguente equazione:

$$Y = Base + \frac{(Vertice - Base)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)Pendenza\ di\ Hill}$$

dove:

Y= risposta (in RLU);

X= logaritmo della concentrazione;

Base= risposta minima;

Vertice= risposta massima;

lg EC_{50} (o lg IC_{50})= logaritmo della concentrazione corrispondente alla risposta situata a metà strada tra la base e il vertice;

pendenza di Hill= pendenza (coefficiente angolare) della curva.

Il modello calcola i valori più vicini ai parametri vertice, base, pendenza di Hill e IC_{50} e EC_{50}. Il calcolo dei valori EC_{50} e IC_{50} si effettua mediante software statistico adeguato (ad es. Graphpad Prism®).

Determinazione di valori anomali

35. È possibile agevolare la qualità del giudizio statistico includendo (ma non limitato a) un test Q (cfr. i protocolli per gli effetti agonista e antagonista) (7) per determinare i pozzetti "inutilizzabili" che saranno esclusi dall'analisi dei dati.

36. Per le repliche dello standard di riferimento E2 (campione composto da due pozzetti), il valore di RLU adattato di una replica a una data concentrazione di E2 è considerato un valore erratico se il suo valore è superiore o inferiore del 20 % al valore di RLU adattato per tale concentrazione nella banca dati storica.

Raccolta e adeguamento dei dati del luminometro per la prova di *range finding*

37. I dati grezzi forniti dal luminometro sono trasferiti su un foglio di calcolo elaborato specificamente per il metodo di prova. Occorre determinare se vi siano punti con valori anomali che devono essere rimossi. (Cfr. Criteri di accettabilità della prova per i parametri ottenuti nelle analisi.) Sono effettuati i calcoli seguenti:

Effetto agonista

Fase 1 Calcolare il valore medio del controllo con mezzo disperdente DMSO (VC).

Fase 2 Sottrarre il valore medio del VC DMSO dal valore ottenuto per ciascun pozzetto al fine di normalizzare i dati.

Fase 3 Calcolare la moltiplicazione media dell'induzione osservata con lo standard di riferimento (E2).

Fase 4 Calcolare il valore medio della EC_{50} per la sostanza chimica in esame.

Effetto antagonista

Fase 1 Calcolare il valore medio di VC DMSO.

Fase 2 Sottrarre il valore medio del VC DMSO dal valore ottenuto per ciascun pozzetto al fine di normalizzare i dati.

Fase 3 Calcolare la moltiplicazione media dell'inibizione osservata con lo standard di riferimento (Ral/E2).

Fase 4 Calcolare il valore medio dello standard di riferimento E2.

Fase 5 Calcolare il valore medio della IC_{50} per le sostanze chimiche in esame.

Raccolta e adeguamento dei dati del luminometro per le prove complete

38. I dati grezzi forniti dal luminometro sono trasferiti su un foglio di calcolo elaborato specificamente per il metodo di prova. Occorre determinare se vi siano punti con valori anomali che devono essere rimossi. (Cfr. Criteri di accettabilità della prova per i parametri ottenuti nelle analisi.) Sono effettuati i calcoli seguenti:

Effetto agonista

Fase 1 Calcolare il valore medio di VC DMSO.

Fase 2 Sottrarre il valore medio del VC DMSO dal valore ottenuto per ciascun pozzetto al fine di normalizzare i dati.

Fase 3 Calcolare la moltiplicazione media dell'induzione osservata con lo standard di riferimento (E2).

Fase 4 Calcolare il valore medio della EC_{50} per l'E2 e per la sostanza chimica in esame, rispettivamente.

Fase 5 Calcolare il valore medio in RLU adattate ottenuto con il metossicloro.

Effetto antagonista

Fase 1 Calcolare il valore medio di VC DMSO.

Fase 2 Sottrarre il valore medio del VC DMSO dal valore ottenuto per ciascun pozzetto al fine di normalizzare i dati.

Fase 3 Calcolare la moltiplicazione media dell'induzione osservata con lo standard di riferimento (Ral/E2).

Fase 4 Calcolare il valore medio della IC_{50} per la miscela Ral/E2 e per le sostanze chimiche in esame, rispettivamente.

Fase 5 Calcolare il valore medio in RLU adattato ottenuto con il tamoxifene.

Fase 6 Calcolare il valore medio dello standard di riferimento E2.

Criteri di interpretazione dei dati

39. Il metodo VM7Luc ER TA è inteso come parte di un approccio basato sulla forza probante dei dati per contribuire a stabilire quali sostanze testare in via prioritaria mediante la prova *in vivo* dell'effetto di perturbazione del sistema endocrino. Una parte di tale procedura di definizione delle priorità consisterà nella classificazione della sostanza chimica in esame come positiva o negativa per l'attività agonista o antagonista sugli ER. I criteri di interpretazione dei risultati positivi e negativi utilizzati nell'ambito dello studio di validazione della prova VM7Luc ER TA sono descritti nella tabella 1.

Tabella 1

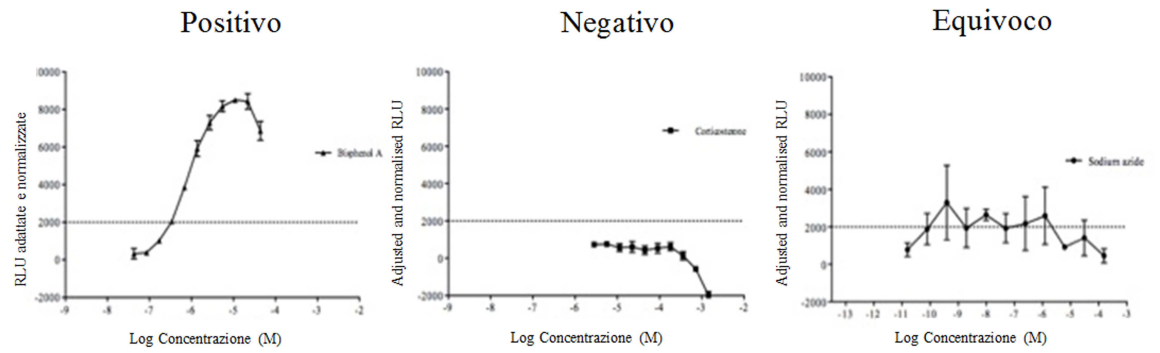
Criteri di interpretazione dei risultati positivi e negativi

ATTIVITÀ AGONISTA	
Positivo	— Tutte le sostanze chimiche in esame classificate come *positive* all'attività agonista sugli ER presentano una curva concentrazione-risposta che consiste in una linea di base, seguita da una pendenza positiva e che si conclude con un *plateau* o un picco. In alcuni casi possono essere definite solo due di queste caratteristiche (pendenza-linea di base o pendenza-picco). — La linea che definisce la pendenza positiva comprende almeno tre punti le cui barre di errore non si sovrappongono (media ± SD). I punti che costituiscono la linea di base sono esclusi, ma la parte lineare della curva può comprendere il picco o il primo punto del *plateau*. — Per essere classificata positiva occorre che la sostanza chimica induca una risposa la cui ampiezza - la differenza tra la linea di base e il picco - sia almeno superiore o uguale al 20 % del valore massimo indotto dallo standard di riferimento E2 (cioè almeno 2 000 RLU se il valore massimo indotto dallo standard di riferimento [E2] è adattato a 10 000 RLU). — Nella misura del possibile, calcolare il valore EC_{50} per ciascuna sostanza chimica positiva.
Negativo	Il valore medio adattato di RLU ottenuto per una data concentrazione è uguale o inferiore al valore medio di RLU del controllo DMSO più tre volte la deviazione standard di RLU del DMSO.
Equivoco	I dati che non possono essere interpretati come validi per stabilire una eventuale attività a causa di importanti limiti qualitativi o quantitativi sono considerati equivoci e non possono servire per determinare se la sostanza chimica in esame è positiva o negativa. In tal caso, occorre testare nuovamente le sostanze chimiche in esame.
ATTIVITÀ ANTAGONISTA	
Positivo	— I dati relativi alla sostanza chimica in esame producono una curva concentrazione-risposta che consiste in una linea di base, seguita da una retta con pendenza negativa. — La retta che definisce la pendenza negativa comprende almeno tre punti le cui barre di errore non si sovrappongono; i punti che costituiscono la linea di base sono esclusi, ma la parte lineare della curva può comprendere il picco o il primo punto del *plateau*. — Si osserva una riduzione di attività di almeno il 20 % rispetto alla risposta massima ottenuta con lo standard di riferimento Ral/E2 (cioè 8 000 RLU o meno se la risposta massima dello standard di riferimento [Ral/E2] è adattata a 10 000 RLU). — Le concentrazioni non citotossiche più elevate della sostanza chimica in esame sono inferiori o uguali a $1x10^{-5}M$. — Nella misura del possibile, calcolare il valore IC_{50} per ciascuna sostanza chimica positiva.
Negativo	Tutti i punti di dati sono superiori al valore EC_{80} (80 % della risposta di E2 o 8 000 RLU) a concentrazioni inferiori a $1,0 \times 10^{-5}M$.
Equivoco	I dati che non possono essere interpretati come validi per stabilire una eventuale attività a causa di importanti limiti qualitativi o quantitativi sono considerati equivoci e non possono servire per determinare se la sostanza chimica in esame è positiva o negativa. In tal caso, occorre testare nuovamente la sostanza chimica in esame.

40. I risultati positivi saranno caratterizzati sia dall'ampiezza dell'effetto sia dalla concentrazione corrispondente a tale effetto, se possibile. I grafici 5 e 6 mostrano esempi di dati positivi, negativi e equivoci.

Grafico 5

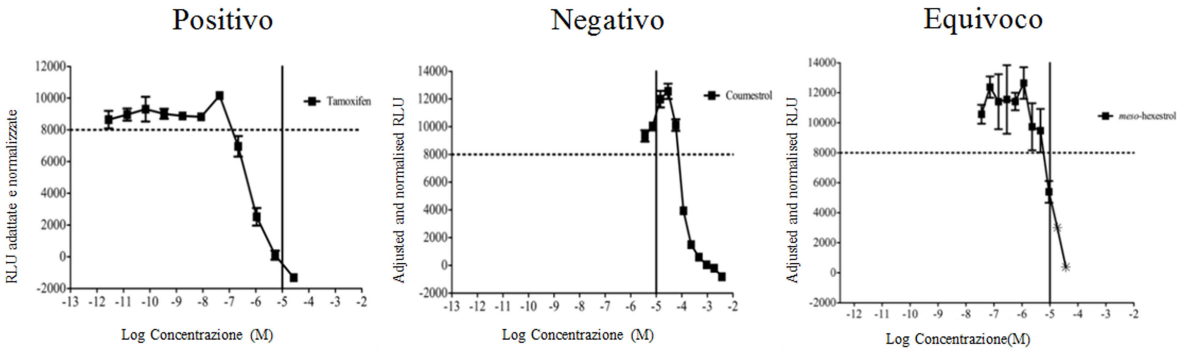
Esempi di risultati positivi, negativi e equivoci per l'effetto agonista



La linea tratteggiata indica il 20 % della risposta di E2, cioè 2 000 RLU (valore adattato e normalizzato).

Grafico 6

Esempi di risultati positivi, negativi e equivoci per l'effetto antagonista



La linea tratteggiata indica l'80 % della risposta di Ral/E2, cioè 8 000 RLU (valore adattato e normalizzato).

La linea continua indica 1,00 x 10^{-5} M. Per essere considerata positiva, la risposta deve essere inferiore alla linea delle 8 000 RLU, e a concentrazioni inferiori a 1,00 x 10^{-5} M.

Le concentrazioni contrassegnate da un asterisco nel grafico del meso-esadestrolo indicano un punteggio di vitalità di «2» o più.

I risultati delle prove per il meso-esestrolo sono considerati equivoci poiché l'unica risposta inferiore a 8 000 RLU corrisponde a una concentrazione di 1,00 x 10^{-5} M.

41. I calcoli dei valori EC_{50} e IC_{50} possono essere effettuati con la funzione di Hill a quattro parametri (cfr. i protocolli per gli effetti agonista e antagonista per maggiori dettagli (7)). Il rispetto dei criteri di accettabilità indica che il sistema funziona correttamente, ma non garantisce che qualsiasi prova produrrà dati accurati. Duplicare i risultati della prima batteria di prove è la migliore garanzia che i dati generati sono accurati (cfr. il paragrafo 19 della sezione "ELEMENTI DEL METODO DI PROVA DEL METODO ER TA").

RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DELLA PROVA

42. Cfr. il paragrafo 20 della sezione "ELEMENTI DEL METODO DI PROVA DEL METODO ER TA").

BIBLIOGRAFIA

(1) ICCVAM: (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, J. Cell Biochem., 82(3): 467-479.

(3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer Res., 58(23): 5 367-5 373.

(4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β, a Modulator of ERα in the Uterus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(11): 936-5 941.

(5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), ALTEX, 23(Suppl): p. 270-273.

(6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Alternatives to Laboratory Animals, 33: p. 261-287.

(7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7 850.

(8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* Mol. *Toxicol.*,13(1):67-82.

(9) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. *Pharmacol.*, 71(10):1 459-69.

(10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology,17(6):646-57.

(11) Kuiper G.G, *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology,139(10):4 252-63.

(12) Geisinger, *et al*. (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(13) Baldwin, *et al*. (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(14) Li, Y., *et al*. (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(15) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors:development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenicand anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

Appendice 4

METODO DI PROVA DI TRANSATTIVAZIONE MEDIANTE IL RECETTORE ESTROGENICO ALFA UMANO TRASFETTATO IN MODO STABILE PER INDIVIDUARE L'ATTIVITÀ AGONISTA E ANTAGONISTA DELLE SOSTANZE CHIMICHE UTILIZZANDO LA LINEA CELLULARE ERA CALUX

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI (CFR. ANCHE INTRODUZIONE GENERALE)

1. Il metodo di prova di transattivazione ERα CALUX utilizza la linea cellulare umana U2OS per individuare l'attività estrogenica agonista e antagonista mediata dal recettore estrogenico alfa umano (hERα). Lo studio di validazione del biosaggio che utilizza la linea cellulare ERα CALUX trasfettata in maniera stabile condotto da BioDetection Systems BV (Amsterdam, Paesi Bassi) ha dimostrato la pertinenza e l'affidabilità della prova ai fini previsti (1). La linea cellulare ERα CALUX esprime unicamente il recettore estrogenico ERα umano trasfettato in modo stabile (2) (3).

2. Il presente metodo di prova è concepito in modo specifico per individuare la transattivazione mediata da hERα misurando la bioluminescenza come endpoint. La bioluminescenza è comunemente usata nei biosaggi a motivo dell'elevato rapporto segnale/rumore (4).

3. È stato riportato che le concentrazioni di fitoestrogeni superiori a 1 μM inducono una sovrattivazione del gene reporter della luciferasi, che genera segnali di luminescenza non mediati dal recettore (5) (6) (7). Pertanto, le concentrazioni più elevate di fitoestrogeni o di altri composti simili che possono sovrattivare l'espressione della luciferasi devono essere esaminate con attenzione nelle prove di transattivazione che utilizzano il recettore estrogenico trasfettato in modo stabile (cfr. l'appendice 2).

4. Le sezioni "INTRODUZIONE GENERALE" e "COMPONENTI DEL METODO DI PROVA ER TA" vanno lette prima di applicare il presente metodo di prova per fini regolamentari. Le definizioni e le abbreviazioni utilizzate nel presente metodo di prova figurano nell'appendice 1.

PRINCIPIO DEL METODO DI PROVA (CFR. ANCHE INTRODUZIONE GENERALE)

5. Il biosaggio serve a valutare la formazione di un legame tra l'ER e il ligando, e la successiva traslocazione del complesso recettore-ligando costituitosi verso il nucleo. Nel nucleo, il complesso recettore-ligando si fissa a elementi di risposta specifici del DNA e transattiva il gene reporter della luciferasi di lucciola, inducendo una maggiore espressione cellulare dell'enzima luciferasi. Dopo l'aggiunta, il substrato della luciferasi (luciferina) viene trasformato in un prodotto bioluminescente. La luce prodotta può essere facilmente individuata e quantificata mediante luminometro.

6. Il sistema di prova utilizza cellule ERα CALUX trasfettate in modo stabile. Le cellule ERα CALUX derivano dalla linea delle cellule umane U2OS osteoblastiche di osteosarcoma. Le cellule umane U2OS sono state trasfettate in modo stabile con 3xHRE-TATA-Luc e pSG5-neo-hERα, mediante il metodo di co-precipitazione del fosfato di calcio. La linea cellulare U2OS è stata selezionata come migliore candidato per fungere da linea cellulare reporter reattiva agli estrogeni (e ad altri ormoni steroidei), poiché presenta un'attività debole o nulla del recettore endogeno. L'assenza di recettori endogeni è stata valutata utilizzando esclusivamente plasmidi reporter della luciferasi, i quali non hanno manifestato alcuna attività quando sono stati aggiunti i ligandi del recettore. Inoltre, questa linea cellulare ha sostenuto forti risposte mediate dagli ormoni quando sono stati introdotti in modo transitorio i recettori apparentati (2) (3) (8).

7. La sperimentazione di sostanze chimiche ad attività estrogenica o antiestrogenica mediante la linea cellulare ERα CALUX include una prova di preselezione e batterie di prove complete. Durante la prova di preselezione, sono determinati la solubilità, la citotossicità e l'intervallo di concentrazione affinato delle sostanze chimiche in esame ai fini delle prove complete. Durante le batterie di prove complete, gli intervalli di concentrazione affinati delle sostanze chimiche in esame sono testati nei biosaggi che utilizzano la linea cellulare ERα CALUX; successivamente, viene stabilita la classificazione delle sostanze chimiche in esame per la loro attività agonista o antagonista.

8. I criteri d'interpretazione dei dati sono descritti in dettaglio al paragrafo 59. In sintesi, una sostanza chimica in esame è considerata positiva per l'attività agonista se almeno due concentrazioni consecutive della sostanza chimica in esame mostrano una risposta uguale o superiore al 10 % della risposta massima dello standard di riferimento 17β-estradiolo (PC_{10}). Una sostanza chimica in esame è considerata positiva per l'attività antagonista se almeno due concentrazioni consecutive della sostanza chimica in esame mostrano una risposta pari o inferiore all'80 % della risposta massima dello standard di riferimento tamoxifene (PC_{80}).

PROCEDURA

Linee cellulari

9. Per il presente metodo di prova si utilizza la linea cellulare U2OS ERα CALUX trasfettata in modo stabile. La linea cellulare può essere ottenuta da *BioDetection Systems BV*, Amsterdam, Paesi Bassi, sottoscrivendo un accordo di licenza tecnica.

10. Vanno utilizzate soltanto colture cellulari prive di micoplasma. I lotti di cellule utilizzati devono essere certificati negativi per la contaminazione da micoplasmi; in alternativa, prima dell'uso deve essere effettuato un test di individuazione di micoplasmi. La RT-PCR (reazione a catena della polimerasi in tempo reale) è utilizzata ai fini della individuazione sensibile di infezioni da micoplasma (4) (5) (9).

Stabilità della linea cellulare

11. Per mantenerne la stabilità e l'integrità, le cellule CALUX vanno conservate in azoto liquido (-80 °C). Dopo lo scongelamento di cellule per avviare una nuova cultura, le cellule sono poste in coltura secondaria almeno due volte prima di essere utilizzate per la valutazione dell'attività estrogenica agonista e antagonista delle sostanze chimiche. Le cellule non sono più coltivate oltre i 30 passaggi.

12. Per monitorare la stabilità della linea cellulare nel tempo, la reattività del sistema di prova agonista e antagonista deve essere verificata mediante la valutazione di EC_{50} o IC_{50} dello standard di riferimento. Occorre inoltre monitorare l'induzione relativa del campione di controllo positivo (PC) e del campione di controllo negativo (NC). I risultati devono essere conformi ai criteri di accettazione per la prova ERα CALUX per quanto concerne l'attività agonista (tabella 3C) o antagonista (tabella 4C). Gli standard di riferimento, i controlli positivi e quelli negativi sono indicati nella tabella 1 (attività agonista) e nella tabella 2 (attività antagonista).

Condizioni di piastratura e di coltura cellulare

13. Le cellule U2OS sono coltivate nel terreno di coltura [DMEM/F12 (1:1) con rosso fenolo come indicatore del pH, integrato da siero fetale bovino (7,5 %), amminoacidi non essenziali (1 %), 10 unità/ml di penicillina, streptomicina e geneticina (G-418) come marcatore di selezione]. Le cellule sono collocate in un incubatore di CO_2 (5 % di CO_2) a 37 °C e al 100 % di umidità. Quando raggiungono una confluenza dell'85-95 %, le cellule sono poste in coltura secondaria oppure preparate per l'inseminazione in piastre da microtitolazione a 96 pozzetti. In questo secondo caso, le cellule sono rimesse in sospensione alla concentrazione di $1x10^5$ cellule/ml nel mezzo di prova privo di estrogeni [DMEM/F12 (1:1) senza rosso fenolo, integrato da siero fetale bovino trattato con carbone-destrano (5 % v/v), amminoacidi non essenziali (1 % v/v), 10 unità/ml di penicillina e streptomicina] e collocate in piastre da microtitolazione a 96 pozzetti (100 µl di sospensione cellulare omogeneizzata). Le cellule sono quindi preincubate in un incubatore di CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, 100 % umidità) per 24 ore prima dell'esposizione. I materiali in plastica devono essere privi di estrogeni.

Criteri di accettabilità

14. Le attività agoniste e antagoniste della sostanza o delle sostanze in esame sono testate in serie. Una serie di prove è composta da un massimo di 6 piastre da microtitolazione. Ciascuna serie di prove contiene almeno 1 serie completa di diluizioni di uno standard di riferimento, di un campione di controllo positivo, di un campione di controllo negativo e di controlli contenenti solvente. Le figure 1 e 2 illustrano la configurazione della piastra per la serie di prove agoniste e antagoniste.

15. Ciascuna diluizione degli standard di riferimento, delle sostanze chimiche in esame, di tutti i controlli con solvente e dei controlli positivi e negativi è analizzata in triplicato. Ciascuna delle analisi in triplicato deve soddisfare i requisiti indicati nelle tabelle 3A e 4A.

16. Una serie completa di diluizioni dello standard di riferimento (17β-estradiolo per l'attività agonista; tamoxifene per l'attività antagonista) è misurata sulla prima piastra in ciascuna serie di prove. Per poter confrontare i risultati delle analisi delle restanti 5 piastre da microtitolazione con la prima piastra da microtitolazione contenente la curva completa concentrazione-risposta dello standard di riferimento, tutte le piastre devono contenere 3 campioni di controllo: il controllo con solvente, la concentrazione più elevata dello standard di riferimento testato e la concentrazione di valore EC_{50} (attività agonista) o IC_{50} (attività antagonista) approssimativa dello standard di riferimento. Il rapporto tra i campioni di controllo medi della prima piastra e le restanti 5 piastre deve essere conforme ai requisiti di cui alla tabella 3C (attività agonista) o alla tabella 4C (attività antagonista).

17. Per ciascuna delle piastre da microtitolazione all'interno di una serie di prove è calcolato il fattore z (10). Il fattore z va calcolato utilizzando le risposte corrispondenti alla concentrazione più alta e più bassa dello standard di riferimento. Una piastra da microtitolazione è considerata valida se soddisfa i requisiti di cui alla tabella 3C (attività agonista) o alla tabella 4C (attività antagonista).

18. Lo standard di riferimento deve dar luogo a una curva sigmoide di dose-risposta. Il valore EC_{50} o IC_{50} derivato dalla risposta della serie di diluizioni dello standard di riferimento deve soddisfare i requisiti indicati nella tabella 3C (attività agonista) o nella tabella 4C (attività antagonista).

19. Ciascuna serie di prove deve contenere un campione di controllo positivo e un campione di controllo negativo. L'induzione relativa calcolata sia sulla base del campione di controllo positivo che di quello negativo deve soddisfare i requisiti indicati nella tabella 3C (attività agonista) o nella tabella 4C (attività antagonista).

20. Durante tutte le misurazioni, il fattore di induzione della concentrazione più alta dello standard di riferimento è misurato dividendo la più elevata risposta media dello standard di riferimento 17β-estradiolo in unità di luce relative (RLU) per la risposta media del controllo con solvente in RLU. Questo fattore di induzione dovrebbe soddisfare i requisiti minimi relativi al fattore moltiplicativo di incremento dell'induzione come indicato nella tabella 3C (attività agonista) o nella tabella 4C (attività antagonista).

21. Solo le piastre da microtitolazione che soddisfano tutti i criteri sopraindicati sono considerate valide e possono essere usate per valutare la risposta delle sostanze chimiche in esame.

22. I criteri di accettazione sono applicabili sia alla prova di preselezione che alle batterie di prove complete.

Tabella 1

Concentrazioni di standard di riferimento, controllo positivo (PC) e controllo negativo (NC) per la prova CALUX di individuazione dell'attività agonista

	Sostanza	Numero CAS	Intervallo di prova (M)
Standard di riferimento	17β-estradiolo	50-28-2	$1*10^{-13}$ - $1*10^{-10}$
Controllo positivo (PC)	17α-metiltestosterone	58-18-4	$3*10^{-6}$
Controllo negativo (NC)	corticosterone	50-22-6	$1*10^{-8}$

Tabella 2

Concentrazioni di standard di riferimento, controllo positivo (PC) e controllo negativo (NC) per la prova CALUX di individuazione dell'attività antagonista

	Sostanza	Numero CAS	Intervallo di prova (M)
Standard di riferimento	tamoxifene	10540-29-1	$3*10^{-9}$ - $1*10^{-5}$
Controllo positivo (PC)	4-idrossitamoxifen	68047-06-3	$1*10^{-9}$
Controllo negativo (NC)	resveratrolo	501-36-0	$1*10^{-5}$

Tabella 3

Criteri di accettazione per la prova ERα CALUX di individuazione dell'attività agonista

A - campioni individuali su una piastra		**Criterio**
1	% massima di SD dei pozzetti in triplicato (per NC, PC, ciascuna diluizione della sostanza chimica in esame e lo standard di riferimento, tranne C0)	< 15 %
2	% massima di SD dei pozzetti in triplicato (per lo standard di riferimento e i controlli con solvente della sostanza chimica in esame (C0, SC))	< 30 %
3	Perdita massima di LDH, come misura della citotossicità.	< 120 %
B - all'interno di una singola piastra da microtitolazione		
4	Rapporto tra il controllo con solvente dello standard di riferimento (C0; piastra 1) e il controllo con solvente della sostanza chimica in esame (SC; piastre da 2 a x)	0,5 - 2,0
5	Rapporto tra il valore approssimativo di EC_{50} e delle concentrazioni più elevate dello standard di riferimento sulla piastra 1 e il valore approssimativo di EC_{50} e delle concentrazioni più elevate dello standard di riferimento sulle piastre da 2 a x (C4, C8)	0,70 - 1,30
6	Fattore Z per ciascuna piastra	> 0,6
C - per una singola serie di analisi (tutte le piastre di una stessa serie)		
7	Curva sigmoide dello standard di riferimento	Sì (17ß-estradiolo)
8	Intervallo di EC_{50} dello standard di riferimento 17ß-estradiolo	$4*10^{-12}$ – $4*10^{-11}$ M
9	Fattore moltiplicatore minimo dell'incremento dell'induzione della concentrazione più elevata di 17ß-estradiolo, rispetto al controllo con solvente dello standard di riferimento.	5
10	Induzione relativa (%) PC.	> 30 %
11	Induzione relativa (%) NC.	< 10 %

Appr.: approssimativo; PC: controllo positivo; NC: controllo negativo: SC: controllo con solvente della sostanza chimica in esame; C0: controllo con solvente dello standard di riferimento; SD: deviazione standard; LDH: lattato deidrogenasi

Tabella 4

Criteri di accettazione per la prova ERα CALUX di individuazione dell'attività antagonista

	A - campioni individuali su una piastra	**Criterio**
1	% massima di SD dei pozzetti in triplicato (per NC, PC, ciascuna diluizione della sostanza chimica in esame, lo standard di riferimento, il controllo con solvente (C0))	< 15 %
2	% massima di SD dei pozzetti in triplicato (per il controllo con mezzo disperdente (VC) e la concentrazione più elevata dello standard di riferimento (C8))	< 30 %
3	Perdita massima di LDH, come misura della citotossicità.	< 120 %
	B - all'interno di una singola piastra da microtitolazione	
4	Rapporto tra il controllo con solvente dello standard di riferimento (C0; piastra 1) e il controllo con solvente della sostanza chimica in esame (SC; piastre da 2 a x)	0,70 - 1,30
5	Rapporto tra il valore approssimativo di IC_{50} dello standard di riferimento sulla piastra 1 e il valore approssimativo di IC_{50} dello standard di riferimento sulle piastre da 2 a x (C4)	0,70 - 1,30
6	Rapporto tra le concentrazioni più elevate dello standard di riferimento sulla piastra 1 e le concentrazioni più elevate dello standard di riferimento sulle piastre da 2 a x (C8)	0,50 - 2,0
7	Fattore Z per ciascuna piastra	> 0,6
	C - per una singola serie di analisi (tutte le piastre di una stessa serie)	
8	Curva sigmoide dello standard di riferimento	Sì (Tamoxifene)
9	Intervallo di IC_{50} dello standard di riferimento (tamoxifene)	$1*10^{-8}$ - $1*10^{-7}$ M
10	Fattore moltiplicatore minimo dell'incremento dell'induzione del controllo con solvente dello standard di riferimento, rispetto alla concentrazione più elevata di Tamoxifene.	2,5
11	Induzione relativa (%) PC.	< 70 %
12	Induzione relativa (%) NC.	> 85 %

Appr.: approssimativo; PC: controllo positivo; NC: controllo negativo: VC: controllo con mezzo disperdente (controllo con solvente senza concentrazione fissa dello standard di riferimento per l'attività agonista); SC: controllo con solvente della sostanza chimica in esame; C0: controllo con solvente dello standard di riferimento; SD: deviazione standard; LDH: lattato deidrogenasi

Controllo con solvente/mezzo disperdente, standard di riferimento, controlli positivi, controlli negativi

23. I controlli con solvente/mezzo disperdente, standard di riferimento, controlli positivi, controlli negativi utilizzati sono identici sia per la prova di preselezione che per le prove complete. Inoltre, la concentrazione degli standard di riferimento, dei controlli positivi e dei controlli negativi deve essere identica.

Controllo con solvente

24. Il solvente usato per sciogliere le sostanze chimiche in esame è testato come controllo con solvente. Il dimetilsolfossido (DMSO, 1 % (v/v); n. CAS 67-68-5) è stato utilizzato come mezzo disperdente durante la validazione del biosaggio ERα CALUX. Se si usa un solvente diverso dal DMSO, tutti gli standard di riferimento, i controlli e le sostanze chimiche in esame devono essere testati nel medesimo mezzo disperdente. Si osservi che, per gli studi di attività antagonista, il controllo con solvente contiene una concentrazione fissa dello standard di riferimento per l'attività agonista, il 17β-estradiolo (approssimativamente la concentrazione EC_{50}). Per testare il solvente utilizzato per gli studi sull'attività antagonista, occorre preparare e testare un controllo con mezzo disperdente.

Controllo con mezzo disperdente (antagonismo)

25. Per la sperimentazione sull'attività antagonista il mezzo di prova è integrato da una concentrazione fissa dello standard di riferimento per l'attività agonista il 17β-estradiolo (approssimativamente la concentrazione EC_{50}). Per testare il solvente usato per sciogliere le sostanze chimiche in esame per l'attività antagonista, occorre preparare un mezzo che non contiene una concentrazione fissa dello standard di riferimento per l'attività agonista (17β-estradiolo). Questo campione di controllo è indicato come controllo con mezzo disperdente. Il dimetilsolfossido (DMSO, 1 % (v/v); n. CAS 67-68-5) è stato utilizzato come mezzo disperdente durante la validazione del biosaggio ERα CALUX. Se si usa un solvente diverso dal DMSO, tutti gli standard di riferimento, i controlli e le sostanze chimiche in esame devono essere testati nel medesimo mezzo disperdente.

Standard di riferimento

26. Lo standard di riferimento per l'attività agonista è il 17β-estradiolo (tabella 1). Gli standard di riferimento includono una serie di diluizioni di otto concentrazioni di 17β-estradiolo ($1*10^{-13}$, $3*10^{-13}$, $1*10^{-12}$, $3*10^{-12}$, $6*10^{-12}$, $1*10^{-11}$, $3*10^{-11}$, $1*10^{-10}$ M).

27. Lo standard di riferimento per l'attività antagonista è il tamoxifene (tabella 2). Gli standard di riferimento includono una serie di diluizioni di otto concentrazioni di tamoxifene ($3*10^{-9}$, $1*10^{-8}$, $3*10^{-8}$, $1*10^{-7}$, $3*10^{-7}$, $1*10^{-6}$, $3*10^{-6}$, $1*10^{-5}$ M). Ciascuna delle concentrazioni dello standard di riferimento per l'attività antagonista è co-incubata con una concentrazione fissa dello standard di riferimento agonista 17β-estradiolo ($3*10^{-12}$ M).

Controllo positivo

28. Il controllo positivo per gli studi di attività agonista è il 17-α-metiltestosterone (tabella 1).

29. Il controllo positivo per gli studi di attività antagonista è il 4-idrossitamoxifene (tabella 2). Il controllo positivo per l'attività antagonista è co-incubato con una concentrazione fissa dello standard di riferimento agonista 17β-estradiolo ($3*10^{-12}$ M).

Controllo negativo

30. Il controllo negativo per gli studi di attività agonista è il corticosterone (tabella 1).

31. Il controllo negativo per gli studi di attività antagonista è il resveratrolo (tabella 2). Il controllo negativo per l'attività antagonista è co-incubato con una concentrazione fissa dello standard di riferimento agonista 17β-estradiolo ($3*10^{-12}$ M).

Dimostrazione della competenza del laboratorio (cfr. il paragrafo 14 e le tabelle 3 e 4 nei «COMPONENTI DEL METODO DI PROVA ER TA» di questo metodo di prova).

Mezzo disperdente

32. Il solvente utilizzato per sciogliere le sostanze chimiche in esame devono solubilizzare completamente la sostanza chimica in esame e risultare miscibile con il mezzo cellulare. Il DMSO, l'acqua e l'etanolo (purezza 95-100 %) sono solventi appropriati. Se si usa il DMSO come solvente, la concentrazione massima di DMSO durante l'incubazione non deve superare 1 % (v/v). Prima dell'uso, il solvente deve essere testato per verificare l'assenza di citotossicità e di interferenza con le prestazioni delle prove.

Preparazione di standard di riferimento, controlli positivi, controlli negativi e sostanze chimiche in esame

33. Gli standard di riferimento, i controlli positivi, i controlli negativi e le sostanze chimiche in esame sono dissolti in 100 % di DMSO (o un solvente appropriato). Diluizioni (in serie) appropriate sono quindi preparate nel medesimo solvente. Prima dello scioglimento, tutte le sostanze sono lasciate riposare fino a raggiungere la temperatura ambiente. Le soluzioni primarie, preparate recentemente, degli standard di riferimento, dei controlli positivi, dei controlli negativi e delle sostanze chimiche in esame non devono presentare precipitato né intorbidimento visibili. Le soluzioni primarie degli standard di riferimento e dei controlli possono essere preparate in anticipo. Le soluzioni primarie delle sostanze chimiche in esame sono preparate immediatamente prima di ciascun esperimento. Le diluizioni finali degli standard di riferimento, dei controlli positivi, dei controlli negativi e delle sostanze chimiche in esame devono essere preparate e utilizzate entro 24 ore prima di ciascuna prova.

Solubilità, citotossicità e intervallo delle concentrazioni

34. Durante la prova di preselezione, si determina la solubilità delle sostanze chimiche in esame nel solvente scelto. È preparata una soluzione primaria di concentrazione massima di 0,1 M. Se tale concentrazione presenta problemi di solubilità, vanno preparate soluzioni primarie di concentrazione inferiore fino a solubilizzazione completa delle sostanze chimiche in esame. Durante la prova di preselezione, sono testate diluizioni successive a 1:10 della sostanza chimica in esame. La concentrazione massima delle prove per l'attività agonista e antagonista è 1 mM. A seguito della prova di preselezione, si ricava un adeguato intervallo di concentrazioni per le sostanze chimiche in esame che deve essere testato nel corso delle batterie di prove complete. Le diluizioni utilizzate per le prove complete devono essere 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x e 3000x.

35. Prove di citotossicità sono condotte nel quadro del protocollo sull'attività agonista e antagonista (11). Tali prove di citotossicità sono condotte sia durante la prova di preselezione che nelle batterie di prove complete. Il metodo utilizzato per valutare la citotossicità durante la validazione della prova ERα CALUX combina la prova di perdita di lattato deidrogenasi (LDH) con un'ispezione visiva qualitativa delle cellule (cfr. l'appendice 4.1) dopo esposizione alle sostanze chimiche in esame. È tuttavia possibile utilizzare altri metodi quantitativi per la determinazione della citotossicità [ad esempio il test colorimetrico al sale di tetrazolium (MTT) o la prova CALUX di citotossicità]. In generale, le concentrazioni della sostanza chimica in esame che mostrano una riduzione di oltre il 20 % della vitalità cellulare sono considerate citotossiche e non possono pertanto essere utilizzate per la valutazione dei dati. Per quanto riguarda la prova di perdita di DLH, la concentrazione della sostanza chimica in esame è considerata citotossica quando la perdita di LDH è superiore al 120 %.

Esposizione alle sostanze chimiche in esame e configurazione della piastra di prova

36. Dopo tripsinazione di un matraccio di cellule confluenti in coltura, le cellule sono nuovamente messe in sospensione alla concentrazione di 1 $x10^5$ cellule/ml nel mezzo di prova privo di estrogeni. 100 µl di cellule rimesse in sospensione sono inserite nei pozzetti interni di una piastra da microtitolazione a 96 pozzetti. I pozzetti esterni sono riempiti con 200 µl di tampone fosfato salino (PBS) (cfr. figure 1 e 2). Le cellule piastrate sono pre-incubate in un incubatore a CO_2 (5 % CO_2, 37 ^oC, 100 % umidità) per 24 ore.

37. Dopo la pre-incubazione, le piastre sono ispezionate visivamente per verificare la citotossicità (cfr. l'appendice 4.1), la contaminazione e la confluenza. Per la prova si usano esclusivamente le piastre che non mostrano citotossicità visiva né contaminazione e presentano una confluenza minima dell'85 %. Il mezzo prelevato dai pozzetti interni è accuratamente rimosso e sostituito da 200 µl di mezzo di prova privo di estrogeni contenente una serie di diluizioni appropriate degli standard di riferimento, delle sostanze chimiche in esame, dei controlli positivi, dei controlli

negativi e dei controlli con solvente (tabella 5: studi dell'attività agonista; tabella 6: studi dell'attività antagonista). Tutti gli standard di riferimento, le sostanze chimiche in esame, i controlli positivi, i controlli negativi e i controlli con solvente sono testati in triplicato. La figura 1 illustra la configurazione della piastra per le prove sull'attività agonista. La figura 2 illustra la configurazione della piastra per le prove sull'attività antagonista. La configurazione della piastra per la prova di preselezione e le prove complete è identica. Per le prove sull'attività antagonista, tutti i pozzetti interni, esclusi i pozzetti dei controlli con mezzo disperdente (VC), contengono anche una concentrazione fissa dello standard di riferimento per l'attività agonista 17β-estradiolo ($3*10^{-12}$ M). Si noti che a ciascuna piastra contenente la sostanza chimica in esame vanno aggiunti gli standard di riferimento C8 e C4.

38. Dopo l'esposizione delle cellule a tutte le sostanze chimiche, le piastre da microtitolazione a 96 pozzetti sono incubate per altre 24 ore in un incubatore a CO_2 (5 % di CO_2, 37 °C, 100 % di umidità).

Figura 1

Configurazione delle piastre da microtitolazione a 96 pozzetti per la prova di preselezione e la valutazione dell'effetto agonista

Piastra 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Piastre successive

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = solvente con standard di riferimento.

C(1-8) = serie di diluizioni (1-8, concentrazioni da deboli a elevate) dello standard di riferimento.

PC = controllo positivo.

NC = controllo negativo.

TCx-(1-8) = diluizioni (1-8, concentrazioni da deboli a elevate) della sostanza chimica in esame per la prova di preselezione e la valutazione dell'effetto agonista della sostanza chimica in esame x.

SC = controllo con solvente della sostanza chimica in esame (di preferenza lo stesso solvente utilizzato in C0, ma eventualmente da un altro lotto).

Caselle grigie: = pozzetti esterni, riempiti con 200 µl di PBS.

Figura 2

Configurazione delle piastre da microtitolazione a 96 pozzetti per la prova di preselezione antagonista e la valutazione dell'effetto antagonista

Piastra 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Piastre successive

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = solvente con standard di riferimento.

C(1-8) = serie di diluizioni (1-8, concentrazioni da deboli a elevate) dello standard di riferimento.

NC = controllo negativo.

PC = controllo positivo.

TCx-(1-8) = diluizioni (1-8, concentrazioni da deboli a elevate) della sostanza chimica in esame per la prova di preselezione e la valutazione dell'effetto agonista della sostanza chimica in esame x.

SC = controllo con solvente della sostanza chimica in esame (di preferenza lo stesso solvente utilizzato in C0, ma eventualmente da un altro lotto).

VC = controllo con mezzo disperdente (controllo con solvente senza concentrazione fissa dello standard di riferimento per l'attività agonista 17β-estradiolo);

Caselle grigie: = pozzetti esterni, riempiti con 200 µl di PBS.

Nota: tutti i pozzetti interni, esclusi i pozzetti dei controlli con mezzo disperdente (VC), contengono anche una concentrazione fissa dello standard di riferimento per l'attività agonista 17β-estradiolo ($3{,}0 * 10^{-12}$ M).

Misurazione della luminescenza

39. La misurazione della luminescenza è descritta dettagliatamente nel protocollo di prova per l'attività agonista e antagonista (10). Il mezzo dei pozzetti è rimosso e le cellule devono essere sottoposte a lisi dopo 24 ore di incubazione per aprire la membrana cellulare e consentire la misurazione dell'attività della luciferasi.

40. Per misurare la luminescenza, questa procedura richiede un luminometro dotato di 2 iniettori. La reazione della luciferasi viene avviata con l'iniezione della luciferina (substrato della luciferasi). La reazione è interrotta aggiungendo 0,2 M NaOH, per impedire il trasferimento di luminescenza da un pozzetto all'altro.

41. La luce emessa da ciascun pozzetto è espressa in unità di luce relative (RLU) per pozzetto.

Prova di preselezione

42. I risultati dell'analisi di preselezione sono usati per determinare un intervallo affinato di concentrazioni delle sostanze chimiche in esame per le prove complete. La valutazione dei risultati delle analisi di preselezione e la determinazione dell'intervallo di concentrazioni affinato delle sostanze chimiche in esame per le prove complete sono descritte in dettaglio nel protocollo di prova sull'attività agonista e antagonista (10). I paragrafi seguenti riassumono le procedure per determinare l'intervallo delle concentrazioni delle sostanze chimiche in esame per le prove sull'attività agonista e antagonista. Cfr. le tabelle 5 e 6 per orientamenti sulla concezione delle diluizioni in serie.

Selezione delle concentrazioni per la valutazione degli effetti agonisti

43. Durante la prova di preselezione, le sostanze chimiche in esame vanno testate usando le serie di diluizioni indicate nelle tabelle 5 (attività agonista) e 6 (attività antagonista). Tutte le concentrazioni sono testate nei pozzetti in triplicato secondo la configurazione della piastra come indicato nella figura 1 (attività agonista) o 2 (attività antagonista).

44. Solo i risultati delle analisi che soddisfano i criteri di accettabilità (tabella 3) sono considerati validi e possono essere usati per valutare la risposta delle sostanze chimiche in esame. Se una o più piastre da microtitolazione in una serie di analisi non soddisfano i criteri di accettazione, tali piastre vanno analizzate nuovamente. Se la prima piastra contenente la serie completa di diluizioni dello standard di riferimento non soddisfa i criteri di accettazione, occorre procedere ad una nuova analisi delle serie di prove complete (6 piastre).

45. Occorre adeguare gli intervalli delle concentrazioni iniziali delle sostanze chimiche in esame e ripetere la prova di preselezione qualora:

— si osservi citotossicità. La procedura di preselezione deve essere ripetuta con concentrazioni inferiori non citotossiche della sostanza chimica in esame.

— la prova di preselezione della sostanza chimica in esame non mostra una curva dose-risposta completa poiché le concentrazioni testate generano un livello di induzione massima. La prova di preselezione deve essere ripetuta con concentrazioni inferiori della sostanza chimica in esame.

46. Quando si osserva una relazione dose-risposta valida, occorre selezionare la (più bassa) concentrazione alla quale si osserva l'induzione massima che non genera citotossicità. La concentrazione più elevata della sostanza chimica in esame da testare nelle prove complete deve essere 3 volte la concentrazione selezionata.

47. Una serie affinata completa di diluizioni della sostanza chimica in esame è preparata seguendo le fasi di diluizione indicate nella tabella 5, iniziando con la concentrazione più elevata come sopra indicato.

48. La sostanza chimica in esame che non produce effetti agonisti è testata nelle batterie di prove complete, cominciando dalla concentrazione non citotossica più elevata individuata durante la preselezione.

Selezione delle concentrazioni per la valutazione degli effetti antagonisti

49. Solo i risultati delle analisi che soddisfano i criteri di accettabilità (tabella 4) sono considerati validi e possono essere usati per valutare la risposta delle sostanze chimiche in esame. Se una o più piastre da microtitolazione in una serie di analisi non soddisfano i criteri di accettazione, tali piastre vanno analizzate nuovamente. Se la prima piastra contenente la serie completa di diluizioni dello standard di riferimento non soddisfa i criteri di accettazione, occorre procedere ad una nuova analisi delle serie di prove complete (6 piastre).

50. Occorre adeguare gli intervalli delle concentrazioni iniziali delle sostanze chimiche in esame e ripetere la prova di preselezione qualora:

— si osservi citotossicità. La procedura di preselezione deve essere ripetuta con concentrazioni inferiori non citotossiche della sostanza chimica in esame.

— la prova di preselezione della sostanza chimica in esame non mostra una curva dose-risposta completa poiché le concentrazioni testate generano un livello di inibizione massima. La preselezione deve essere ripetuta con concentrazioni inferiori della sostanza chimica in esame.

51. Quando si riscontra una relazione dose-risposta valida, occorre selezionare la (più bassa) concentrazione alla quale si osserva l'inibizione massima che non genera citotossicità. La concentrazione più elevata della sostanza chimica in esame da testare nelle prove complete deve essere 3 volte la concentrazione selezionata.

52. Una serie affinata completa di diluizioni della sostanza chimica in esame è preparata seguendo le fasi di diluizione indicate nella tabella 6, iniziando con la concentrazione più elevata come sopra indicato.

53. Le sostanze chimiche in esame che non producono effetti antagonisti sono testate nelle batterie di prove complete, cominciando dalla concentrazione non citotossica più elevata testata durante la preselezione.

Prove complete

54. A seguito della selezione degli intervalli affinati di concentrazioni, le sostanze chimiche in esame sono testate in maniera esaustiva usando le serie di diluizioni indicate nelle tabelle 5 (attività agonista) e 6 (attività antagonista). Tutte le concentrazioni sono testate nei pozzetti in triplicato secondo la configurazione della piastra come indicato nella figura 1 (attività agonista) o 2 (attività antagonista).

55. Solo i risultati delle analisi che soddisfano i criteri di accettabilità (tabella 3 e 4) sono considerati validi e possono essere usati per valutare la risposta delle sostanze chimiche in esame. Se una o più piastre da microtitolazione in una serie di analisi non soddisfano i criteri di accettazione, tali piastre vanno analizzate nuovamente. Se la prima piastra contenente la serie completa di diluizioni dello standard di riferimento non soddisfa i criteri di accettazione, occorre procedere ad una nuova analisi delle serie di prove complete (6 piastre).

Tabella 5

Concentrazione e diluizioni degli standard di riferimento, dei controlli e delle sostanze chimiche in esame utilizzati per le prove sull'attività agonista

Conc. (M) dello standard di riferimento 17β-estradiolo		Diluizione della TCx durante la prova di *range finding*		Diluizione della TCx durante la prova completa		Conc. (M) dei controlli	
C0	0	TCx-1	10000000 x	TCx-1	3000 x	PC	$3*10^{-6}$
C1	$1*10^{-13}$	TCx-2	1000000 x	TCx-2	1000 x	NC	$1*10^{-8}$
C2	$3*10^{-13}$	TCx-3	100000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$1*10^{-12}$	TCx-4	10000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$3*10^{-12}$	TCx-5	1000 x	TCx-5	30 x		
C5	$6*10^{-12}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1*10^{-11}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3*10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1*10^{-10}$						

TCx - sostanza chimica in esame x
PC - controllo positivo (17α-metiltestosterone)
NC - controllo negativo (corticosterone)
C0 - controllo con solvente dello standard di riferimento
SC - controllo con solvente della sostanza chimica in esame

Tabella 6

Concentrazione e diluizioni degli standard di riferimento, dei controlli e delle sostanze chimiche in esame utilizzati per la prova sugli antagonisti

Conc. (M) dello standard di riferimento tamoxifene		Diluizione della TCx durante la prova di *range finding*		Diluizione della TCx durante la prova completa		Conc. (M) dei controlli	
C0	0	TCx-1	10000000 x	TCx-1	3000 x	PC	$1*10^{-9}$
C1	$3*10^{-9}$	TCx-2	1000000 x	TCx-2	1000 x	NC	$1*10^{-5}$
C2	$1*10^{-8}$	TCx-3	100000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3*10^{-8}$	TCx-4	10000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1*10^{-7}$	TCx-5	1000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3*10^{-7}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Conc. (M) dello standard di riferimento agonista**	
C6	$1*10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**Conc. (M) dello**	
C7	$3*10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-estradiolo	$3*10^{-12}$
C8	$1*10^{-5}$						

TCx - sostanza chimica in esame x
PC - controllo positivo (4-idrossitamixefene)
NC - controllo negativo (resveratrolo)
C0 - controllo con solvente dello standard di riferimento
SC - controllo con solvente della sostanza chimica in esame
VC - controllo con mezzo disperdente (non contiene una concentrazione fissa dello standard di riferimento agonista 17β-estradiolo ($3*10^{-12}$ M).

Raccolta e analisi dei dati

56. A seguito della prova di preselezione e delle prove complete, i valori EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50} e l'induzione massima (TCx_{max}) di una sostanza chimica in esame sono determinati per la prova sull'attività agonista. Per la prova sull'attività antagonista, vanno calcolati i valori IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50} e l'induzione massima (TCx_{min}). I grafici 3 (attività agonista) e 4 (attività antagonista) illustrano questi parametri. I parametri richiesti sono calcolati in base all'induzione relativa di ciascuna sostanza chimica in esame [rispetto all'induzione massima dello standard di riferimento (= 100 %)]. Per la valutazione dei dati si utilizza la regressione non lineare (pendenza variabile, 4 parametri) applicando alla seguente equazione:

$$Y = Base + \frac{(Vertice - Base)}{(1 + 10^{(lgEC_{50} - X) \times Pendenza\ di\ Hill})}$$

dove:

X = Log della dose o concentrazione

Y = Risposta (induzione relativa (%))

Vertice = Induzione massima (%)

Base = Induzione minima (%)

$LogEC_{50}$ = Logaritmo della concentrazione corrispondente al 50 % della risposta massima

Pendenza di Hill = coefficiente della pendenza di Hill

57. I dati grezzi del luminometro, espressi in unità di luce relative (RLU), sono trasferiti al foglio di calcolo contenente l'analisi dei dati destinata alla preselezione e alle batterie di prove complete. I dati grezzi devono soddisfare i criteri di accettazione indicati nella tabella 3A e nella tabella 3B (attività agonista) o 4A e 4B (attività antagonista). Se i dati grezzi soddisfano i criteri di accettazione, si eseguono le seguenti fasi di calcolo per determinare i parametri richiesti:

Attività agonista

— Sottrarre le RLU medie del controllo con solvente dello standard di riferimento da ciascuno dei dati grezzi delle analisi relativi agli standard di riferimento.

— Sottrarre le RLU medie del controllo con solvente della sostanza chimica in esame da ciascuno dei dati grezzi delle analisi relativi alle sostanze chimiche in esame.

— Calcolare l'induzione relativa di ciascuna concentrazione dello standard di riferimento; fissare al 100 % l'induzione della concentrazione più elevata dello standard di riferimento.

— Calcolare l'induzione relativa di ciascuna concentrazione della sostanza chimica in esame rispetto alla concentrazione massima dello standard di riferimento al 100 %.

— Valutare i risultati dell'analisi seguendo una curva di regressione non lineare (pendenza variabile, 4 parametri).

— Determinare i valori EC_{50} e EC_{10} dello standard di riferimento.

— Determinare i valori EC_{50} e EC_{10} delle sostanze chimiche in esame.

— Determinare l'induzione relativa massima della sostanza chimica in esame (TC_{max}).

— Determinare i valori PC_{10} e PC_{50} delle sostanze chimiche in esame.

Per le sostanze chimiche in esame, non è sempre possibile ottenere una curva dose-risposta completa a motivo, ad esempio, di problemi di citotossicità o di solubilità. Pertanto i valori EC_{50}, EC_{10} e PC_{50} non possono essere determinati. In tal caso, solo i valori PC_{10} e TC_{max} possono essere determinati.

Attività antagonista

— Sottrarre le RLU medie della più elevata concentrazione dello standard di riferimento da ciascuno dei dati grezzi delle analisi relativi agli standard di riferimento.

— Sottrarre le RLU medie della più elevata concentrazione dello standard di riferimento da ciascuno dei dati grezzi delle analisi relativi alle sostanze chimiche in esame.

— Calcolare l'induzione relativa di ciascuna concentrazione dello standard di riferimento; fissare al 100 % l'induzione della concentrazione più bassa dello standard di riferimento.

— Calcolare l'induzione relativa di ciascuna concentrazione della sostanza chimica in esame rispetto alla concentrazione più bassa dello standard di riferimento al 100 %.

— Valutare i risultati dell'analisi seguendo una curva di regressione non lineare (pendenza variabile, 4 parametri).

— Determinare i valori IC_{50} e IC_{20} dello standard di riferimento.

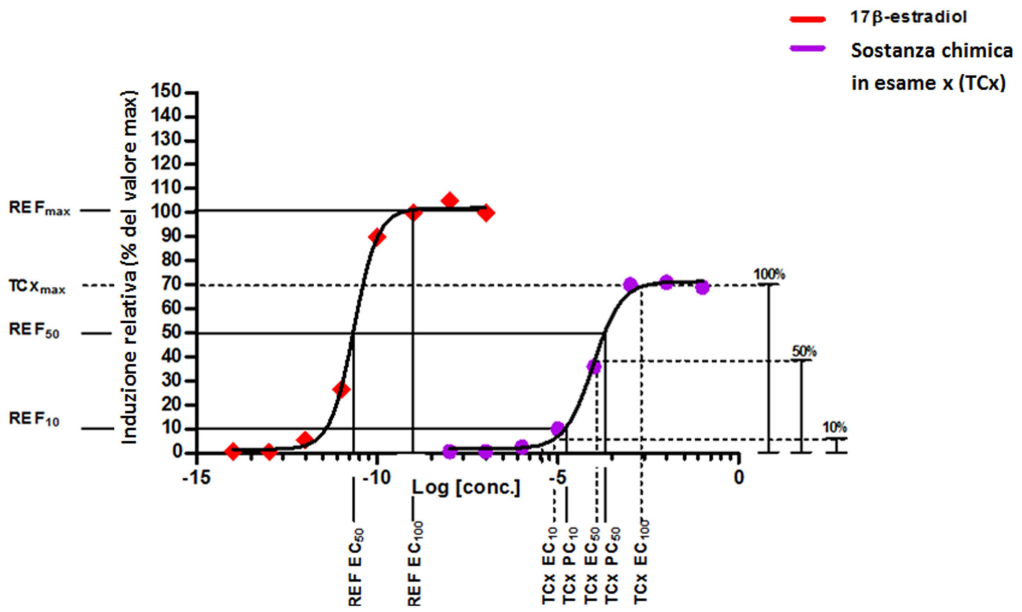
— Determinare i valori IC_{50} e IC_{20} delle sostanze chimiche in esame.

— Determinare l'induzione relativa minima della sostanza chimica in esame (TC_{min}).

— Determinare i valori PC_{80} e PC_{50} delle sostanze chimiche in esame.

Grafico 3

Parametri determinati nella prova sull'effetto agonista



EC_{10} = concentrazione di una sostanza corrispondente al 10 % della sua risposta massima

EC_{50} = concentrazione di una sostanza corrispondente al 50 % della sua risposta massima

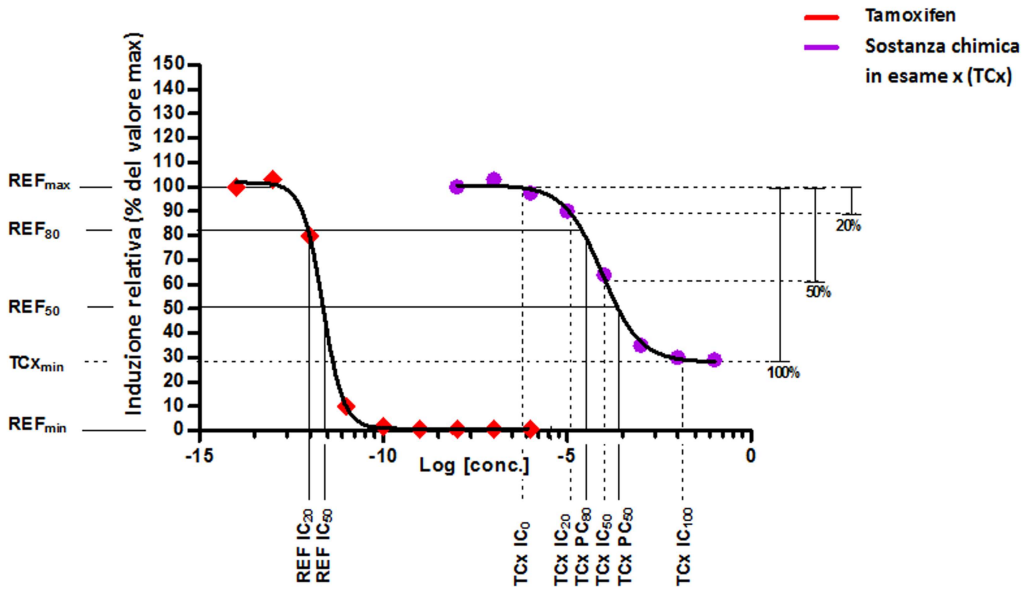
PC_{10} = concentrazione della sostanza chimica in esame equivalente alla EC_{10} dello standard di riferimento.

PC_{50} = concentrazione della sostanza chimica in esame equivalente alla EC_{50} dello standard di riferimento.

TCx_{max} = induzione relativa massima della sostanza chimica in esame.

Grafico 4

Parametri determinati nella prova sull'effetto antagonista



IC_{20} = concentrazione di una sostanza corrispondente all'80 % della sua risposta massima (20 % di inibizione)

IC_{50} = concentrazione di una sostanza corrispondente all'50 % della sua risposta massima (50 % di inibizione)

PC_{80} = concentrazione di una sostanza chimica in esame equivalente alla IC_{20} dello standard di riferimento.

PC_{50} = concentrazione di una sostanza chimica in esame equivalente alla IC50 dello standard di riferimento.

TCx_{min} = induzione relativa minima della sostanza chimica in esame.

Per le sostanze chimiche in esame, non è sempre possibile ottenere una curva dose-risposta completa a motivo, ad esempio, di problemi di citotossicità o di solubilità. Pertanto i valori IC_{50}, IC_{20} e PC_{50} non possono essere determinati. In tal caso, solo i valori PC_{20} e TC_{min} possono essere determinati.

58. I risultati dovrebbero basarsi su due (o tre) batterie di prove indipendenti. Se due batterie di prove forniscono risultati comparabili e pertanto riproducibili, non è necessario effettuare una terza batteria di prove. Per essere accettabili, i risultati devono:

— soddisfare i criteri di accettabilità (cfr. i criteri di accettabilità, paragrafi da 14 a 22);

— essere riproducibili.

Criteri di interpretazione dei dati

59. Per interpretare i dati e decidere se una sostanza chimica in esame è considerata positiva o negativa, si utilizzano i seguenti criteri:

Attività agonista

Per ciascuna prova completa, una sostanza chimica è considerata **positiva** se:

1 Il valore TC_{max} è uguale o superiore al 10 % della risposta massima dello standard di riferimento (REF_{10}).

2 Almeno 2 concentrazioni consecutive della sostanza chimica in esame sono uguali o superiori al REF_{10}.

Per ciascuna prova completa, una sostanza chimica è considerata **negativa** se:

1 Il valore TC_{max} non è superiore al 10 % della risposta massima dello standard di riferimento (REF_{10}).

2 Meno di 2 concentrazioni della sostanza chimica in esame sono uguali o superiori al REF_{10}.

Attività antagonista

Per ciascuna prova completa, una sostanza chimica è considerata **positiva** se:

1 Il valore TC_{min} è uguale o inferiore all'80 % della risposta massima dello standard di riferimento (REF_{80} = 20 % di inibizione).

2 Almeno 2 concentrazioni consecutive della sostanza chimica in esame sono uguali o inferiori al REF_{80}.

Per ciascuna prova completa, una sostanza chimica è considerata **negativa** se:

1 Il valore TC_{min} è superiore all'80 % della risposta massima dello standard di riferimento (REF_{80} = 20 % di inibizione).

2 Meno di 2 concentrazioni della sostanza chimica in esame sono uguali o inferiori al REF_{80}.

60. Per caratterizzare la potenza della reazione positiva di una sostanza chimica in esame, l'ampiezza dell'effetto (attività agonista: TC_{max}; attività antagonista: TC_{min}) e la concentrazione alla quale si verifica l'effetto (attività agonista: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}; attività antagonista: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}) sono riportate.

RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DELLA PROVA

61. Cfr. il paragrafo 20 della sezione "ELEMENTI DEL METODO DI PROVA DEL METODO ER TA").

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ERα CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136-148.

(3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, and van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER)α and not through ERβ. *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.

(4) Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology17(6):646-57.

(5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V and Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.

(6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

(7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.,* 122, 204–211.

(8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, and van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.,* 89(1), 173–187.

(9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M and Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.,* 57(4), 769-771.

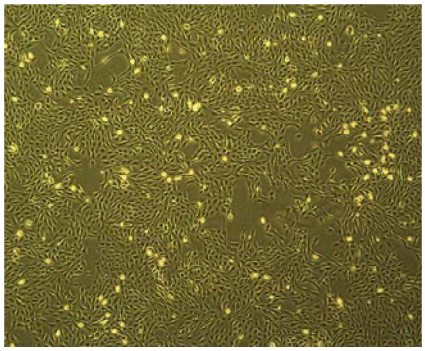
(10) Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays. J. Biomol. Scr., 4, 67-73

(11) Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, the Netherlands.

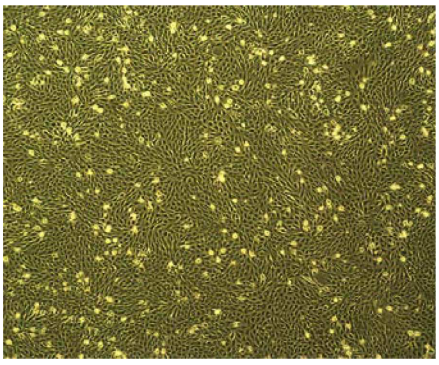
Appendice 4.1:

ISPEZIONE VISIVA DELLA VITALITÀ CELLULARE

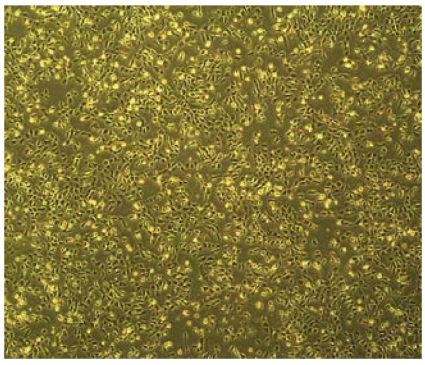
Confluenza < 5 %. Le cellule sono appena state inseminate. Vitalità cellulare del 100 %. Classificazione: "nessuna citotossicità"



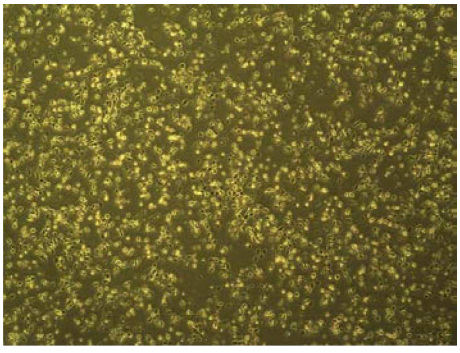
Confluenza < 85 %. A questo stadio, le cellule sono esposte alle sostanze chimiche in esame. Vitalità cellulare > 95 %.Classificazione: "nessuna citotossicità"



Confluenza < 95 %. Le cellule sono densamente organizzate e cominciano a proliferare. Vitalità cellulare > 95 %.Classificazione: "nessuna citotossicità"



Vitalità cellulare < 25 %. Le cellule cominciano a staccarsi, il contatto tra cellule diminuisce. Le cellule sono arrotondate. Classificazione: "citotossicità"



Vitalità cellulare < 5 %. Le cellule sono completamente staccate, il contatto tra le cellule è interrotto. Le cellule sono arrotondate. Classificazione: "citotossicità"

B.67 **PROVE *IN VITRO* DI MUTAZIONE GENICA SU CELLULE DI MAMMIFERO UTILIZZANDO IL GENE TIMIDINA CHINASI**

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 490 (2016). I metodi di prova vengono periodicamente riesaminati e rivisti alla luce dei progressi scientifici, delle esigenze in materia di regolamentazione, e di considerazioni relative al benessere degli animali. La prova sul linfoma di topo (MLA) e la prova TK6 con il locus timidina chinasi (TK) erano in origine contenute nel metodo di prova B.17. Successivamente il gruppo di lavoro degli esperti MLA dell'*International Workshop on Genotoxicity Testing* (IWGT) ha elaborato raccomandazioni armonizzate a livello internazionale per i criteri di accettazione delle prove e per l'interpretazione dei dati della prova MLA (1)(2)(3)(4)(5), che sono state inserite nel presente nuovo metodo di prova B.67. Il presente metodo di prova è elaborato per la prova MLA e, poiché usa anche il locus TK, anche per la prova TK6. La prova MLA è ampiamente usata a fini regolamentari, mentre la prova TK6 è stata usata molto meno frequentemente. Va osservato che, nonostante le similitudini fra gli endpoint, le due linee cellulari non sono intercambiabili e i programmi regolamentari possono esprimere validamente una preferenza per l'una o l'altra, a seconda di un particolare uso regolamentare. A titolo di esempio, la validazione della prova MLA ne ha dimostrato l'idoneità a rilevare non solo la mutazione genica, bensì anche la capacità di una sostanza chimica in esame di indurre danni strutturali a carico dei cromosomi. Il presente metodo di prova è parte integrante di una serie di metodi di prova sulla tossicologia genetica. Un documento contenente informazioni succinte sulle prove di tossicologia genetica dell'OCSE, comprensivo di un compendio delle modifiche recentemente apportate alla rispettiva linea guida è stato elaborato dall'OCSE (6).

2. Scopo della prova *in vitro* di mutazione genica su cellule di mammifero è identificare mutazioni geniche indotte da sostanze chimiche. Le linee cellulari utilizzate in queste prove misurano le mutazioni "in avanti" dei geni reporter, in particolare il gene endogeno timidina chinasi (*TK* per le cellule umane e *Tk* per le cellule di roditori, denominate collettivamente *TK* in questo metodo di prova). Il presente metodo di prova è destinato a essere usato con due linee cellulari: le cellule di linfoma di topo L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C (in generale denominate L5178Y) e le cellule linfoblastoidi umane TK6 (in generale denominate TK6). Sebbene le due linee cellulari differiscano a causa della loro origine, crescita cellulare, status del gene p53, ecc., le prove di mutazione genica *TK* possono essere effettuate in maniera simile su entrambi i tipi di cellule, come illustrato nel presente metodo di prova.

3. La natura autosomica ed eterozigote del gene timidina chinasi consente di individuare colonie vitali le cui cellule sono carenti dell'enzima timidina chinasi in seguito a una mutazione da $TK^{+/-}$ a $TK^{-/-}$. Tale carenza può risultare da fenomeni genetici che colpiscono il gene *TK*, compresi sia le mutazioni genetiche (mutazioni puntiformi, mutazioni per spostamento del sistema di lettura, piccole delezioni, ecc.) che i fenomeni cromosomici (ampie delezioni, riarrangiamenti cromosomici e ricombinazione mitotica). Questi ultimi fenomeni sono espressi come perdita di eterozigosi, ossia un cambiamento genetico comune dei geni soppressori dei tumori nell'oncogenesi umana. Teoricamente, nella prova MLA si può rilevare la perdita dell'intero cromosoma portante il gene *TK* che fa seguito al danneggiamento dell'elica e/o alla non disgiunzione mitotica. In effetti una combinazione di analisi citogenetica e molecolare mostra chiaramente che alcuni mutanti MLA TK sono il risultato di una non disgiunzione. Il peso dell'evidenza mostra tuttavia che le prove di mutazione genica *TK* non possono rilevare in modo affidabile gli aneugeni applicando i criteri standard di citotossicità (come descritto nel presente metodo di prova) e pertanto non è appropriato utilizzare tali metodi di prova per rilevare gli aneugeni (7) (8) (9).

4. Nelle prove di mutazione genica *TK*, si generano due classi fenotipiche distinte di mutanti *TK*; i mutanti aventi una crescita normale che crescono allo stesso ritmo delle cellule eterozigoti TK e i mutanti aventi una crescita lenta che crescono con tempi di raddoppiamento prolungati. I mutanti a crescita normale e i mutanti a crescita lenta si riconoscono nella prova MLA come mutanti che producono colonie grandi e mutanti che producono colonie piccole e, nella prova TK6, come mutanti che producono colonie a comparsa precoce e mutanti che producono colonie a comparsa tardiva. La natura molecolare e citogenetica dei due tipi di mutanti (quelli che producono colonie grandi e quelli che producono colonie piccole nella prova MLA) è stata studiata in modo approfondito (8) (10) (11) (12) (13). La natura molecolare e citogenetica dei due tipi di mutanti TK6 a comparsa precoce e a comparsa tardiva è stata anch'essa ampiamente studiata (14) (15) (16) (17). I mutanti a crescita lenta di entrambi i tipi di cellule hanno subito danni genetici che comportano uno o più geni che si presumono responsabili di regolare la crescita presso il locus *TK*, il che determina tempi di raddoppiamento prolungati e la formazione di piccole colonie o a comparsa tardiva (18). La presenza di mutanti a crescita lenta è stata messa in relazione con sostanze chimiche che causano rilevanti cambiamenti strutturali a livello cromosomico. Le cellule i cui danni non riguardano il o i geni che si presumono responsabili di regolare la crescita presso il locus *TK* crescono a una velocità analoga a quella delle cellule parentali e diventano mutanti a crescita normale. L'induzione di mutanti principalmente a crescita normale è associata a sostanze chimiche che fungono principalmente da mutageni puntiformi. È quindi fondamentale conteggiare sia i mutanti a crescita lenta che quelli a crescita normale, al fine di recuperare tutti i mutanti e ottenere informazioni sul o sui tipi di danni (mutageni o clastogeni) indotti dalla sostanza chimica in esame (10) (12) (18) (19).

5. Il metodo di prova è organizzato in modo da fornire informazioni generali applicabili a entrambe le prove MLA e TK6 nonché orientamenti specializzati per le singole prove.

6. Le definizioni usate sono riportate nell'appendice 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

7. Le prove *in vitro* richiedono in generale l'uso di una fonte esogena di attivazione metabolica. Il sistema esogeno di attivazione metabolica non simula perfettamente le condizioni *in vivo*.

8. Occorre adoperarsi per evitare condizioni che porterebbero a falsi risultati positivi (vale a dire potenziali interazioni con il sistema di prova), non causati da un'interazione fra la sostanza chimica in esame e il materiale genetico della cellula; tali condizioni includono modifiche del pH o dell'osmolalità, un'interazione con i componenti del terreno di coltura (20) (21) o una eccessiva citotossicità (22)(23)(24). Per le prove MLA e TK6 è considerata eccessiva una citotossicità che superi i massimi livelli di citotossicità raccomandati definiti al paragrafo 28. Va inoltre osservato che le sostanze chimiche in esame analoghe della timidina o che si comportano come gli analoghi della timidina possono aumentare la frequenza dei mutanti mediante crescita selettiva dei mutanti spontanei di fondo durante il trattamento delle cellule e richiedono metodi di prova supplementari ai fini di un'adeguata valutazione (25).

9. Possono essere necessari adattamenti specifici di questo metodo di prova, non descritti in questa sede, per i nanomateriali di sintesi.

10. Prima di applicare il presente metodo di prova a una miscela per generare dati ai fini regolamentari previsti, si deve considerare se, e in caso affermativo, perché, esso possa fornire risultati adeguati a tale scopo. Tale verifica non è necessaria se la miscela viene sottoposta a prova in ottemperanza a un obbligo regolamentare.

11. Le cellule mutanti carenti di attività enzimatica della timidina chinasi a causa della mutazione $TK^{+/-} \longrightarrow TK^{-/-}$ sono resistenti agli effetti citostatici dell'analogo pirimidinico trifluorotimidina (TFT). Le cellule capaci di produrre *TK* sono sensibili alla TFT, che provoca l'inibizione del metabolismo cellulare e arresta la divisione cellulare. Di conseguenza, le cellule mutanti sono in grado di proliferare in presenza di TFT e di formare colonie, mentre le cellule contenenti l'enzima TK non lo sono.

PRINCIPIO DELLA PROVA

12. Le cellule in sospensione sono esposte alla sostanza in esame, con e senza fonte esogena di attivazione metabolica (cfr. il paragrafo 19), per un tempo adeguato (cfr. il paragrafo 33), poi si allestiscono sub-culture per determinare la citotossicità e permettere l'espressione fenotipica prima della selezione dei mutanti. La citotossicità è determinata dalla crescita relativa totale (RTG - cfr. il paragrafo 25) per la prova MLA e dal tasso di sopravvivenza relativa (RS - cfr. il paragrafo 26) per la prova TK6. Le colture trattate sono mantenute nel terreno di coltura per un periodo sufficiente, specifico per ciascun tipo cellulare (cfr. il paragrafo 37), per permettere l'espressione fenotipica ottimale delle mutazioni indotte. Secondo l'espressione fenotipica, la frequenza dei mutanti è determinata mediante inseminazione di un numero noto di cellule in terreno contenente l'agente selettivo, per individuare le colonie mutanti, e in terreno non contenente l'agente selettivo, per determinare l'efficacia di clonazione (vitalità). Dopo un adeguato periodo di incubazione le colonie sono contate. La frequenza dei mutanti è calcolata sulla base del numero di colonie di mutanti corretto per l'efficienza di clonazione al momento della selezione dei mutanti.

DESCRIZIONE DEL METODO

Preparazioni

Cellule

13. Per la prova MLA: poiché il metodo di prova MLA è stato elaborato e caratterizzato dal ricorso alla sottolinea $TK^{+/-}$ −3.7.2C di cellule L5178Y, per la presente prova si deve utilizzare questa sottolinea specifica. La linea cellulare L5178Y è stata derivata da un linfoma timico indotto da metilcolantrene in un topo DBA-2 (26). Clive e colleghi hanno trattato le cellule L5178Y (indicate da Clive come $TK^{+/+}$ −3) con etilmetan sulfonato e hanno isolato un clone

$TK^{-/-}$ (indicato come $TK^{-/-}$ −3.7), utilizzando bromodeossiuridina come agente selettivo. A partire dal clone $TK^{-/-}$ sono stati isolati e caratterizzati per essere utilizzati nella prova MLA un clone spontaneo $TK^{+/-}$ (indicato come $TK^{+/-}$ −3.7.2.) e un sottoclone (indicato come $TK^{+/-}$−3.7.2C) (27). Il cariotipo della linea cellulare è stato pubblicato (28)(29)(30)(31). Il numero modale dei cromosomi è 40. Vi è un cromosoma metacentrico (t12;13) che deve essere conteggiato come un cromosoma. Nel topo il locus *TK* è situato all'estremità distale del cromosoma 11. La linea cellulare L5178Y $TK^{+/-}$ −3.7.2C presenta mutazioni in entrambi gli alleli p53 e produce la proteina mutante p53 (32) (33). Si presume che la capacità di individuare danni su ampia scala sia riconducibile allo status p53 della linea cellulare $TK^{+/-}$−3.7.2C (17).

14. Per la prova TK6: si tratta di una linea cellulare linfoblastoide umana. La linea cellulare parentale consiste nella linea cellulare trasformata dal virus di Epstein-Barr WI-L2, in origine derivata da un soggetto maschio di cinque anni affetto da sferocitosi ereditaria. Il primo clone isolato, HH4, è stato mutagenizzato con ICR191 e si è generata una linea cellulare eterozigote *TK*, TK6 (34). Le cellule TK6 sono quasi diploidi e il cariotipo rappresentativo è 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Nell'uomo il locus *TK* è situato sul braccio lungo del cromosoma 17. La prova TK6 è una linea cellulare competente per il gene p53, in quanto presenta una sequenza p53 di tipo casuale su entrambi gli alleli ed esprime unicamente la proteina p53 di tipo casuale (36).

15. In entrambe le prove MLA e TK6, quando si costituisce o si ricostituisce una popolazione di cellule, si raccomanda al laboratorio che esegue la prova di garantire l'assenza di contaminazione da *Mycoplasma*, di procedere al cariotipaggio delle cellule o colorare i cromosomi che presentano il locus *TK* e di controllare i tempi di raddoppiamento della popolazione. Occorre stabilire la durata normale del ciclo cellulare delle linee cellulari utilizzate nel laboratorio di prova, che deve essere coerente con le caratteristiche cellulari pubblicate (16) (19) (37). Tale popolazione madre va conservata a -150 °C o a temperatura inferiore e va utilizzata per preparare tutti gli stock cellulari di lavoro.

16. Prima di costituire un ampio numero di stock di lavoro crioconservati o appena prima di utilizzarli in un esperimento, la coltura può dover essere ripulita delle cellule mutanti preesistenti [salvo nel caso in cui la frequenza dei mutanti (MF) nel solvente di controllo si trovi già entro l'intervallo accettabile, cfr. tabella 2 per la prova MLA)]. Questo avviene utilizzando metotressato (aminopterina) per scartare le cellule carenti in TK e aggiungendo alla coltura timidina, ipoxantina e glicina (L5178Y) o 2'-deossicitidina (TK6) al fine di garantire la crescita ottimale delle cellule competenti per la TK (19)(38)(39) (e (40) per la prova TK6). Ai paragrafi (19)(31)(37)(39)(41) figurano le indicazioni generali relative alle buone prassi per il mantenimento delle colture cellulari nonché raccomandazioni specifiche relative alle cellule L5178Y e TK6. Per i laboratori che necessitano di popolazioni cellulari madri per avviare la prova MLA o TK6 o che devono ottenere nuove popolazioni madri, è disponibile una banca di cellule qualificata (37).

Terreni e condizioni di coltura

17. Per entrambe le prove, le colture vanno mantenute in terreni di coltura e condizioni di incubazione (ad es. recipienti di coltura, atmosfera umidificata al 5 % di CO_2, temperatura di incubazione di 37 °C) adeguati. Le colture cellulari sono sempre mantenute in condizioni che garantiscano una crescita in fase esponenziale. È particolarmente importante che i terreni e le condizioni di coltura siano scelti in modo da garantire la crescita ottimale delle cellule durante il periodo di espressione e di clonazione delle cellule mutanti e non mutanti. Nelle prove MLA e TK6 è altresì importante che le condizioni di coltura garantiscano una crescita ottimale dei mutanti TK delle grandi colonie/a comparsa precoce come delle piccole colonie/a comparsa tardiva. Ai paragrafi (19)(31)(38)(39)(40)(42) sono reperibili maggiori particolari relativi alla coltura, compresa l'esigenza di inattivare termicamente il siero di cavallo se si utilizza il terreno di coltura RPMI nella selezione dei mutanti.

Preparazione delle colture

18. Le cellule provengono da colture primarie, sono inseminate in un terreno di coltura ad una densità tale che le colture in sospensione proseguiranno la loro crescita esponenziale durante le fasi di trattamento ed espressione.

Attivazione metabolica

19. Se si utilizzano cellule L5178Y e TK6 in quanto prive di un'adeguata capacità di attivazione metabolica endogena, si deve ricorrere a sistemi di attivazione metabolica esogeni. Il sistema più comunemente usato, raccomandato in tutti i casi salvo alternativa motivata, è una frazione post-mitocondriale integrata di cofattore (S9), prelevata dal fegato di roditori (in generale ratti) trattati con induttori enzimatici come Aroclor 1254 (43) (44) (45) o con una combinazione di fenobarbitone e β-naftoflavone (46) (47) (48) (49) (50) (51). Quest'ultima combinazione è conforme alla convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti (52) e ha dimostrato di essere tanto efficace quanto

l'Aroclor 1254 nell'indurre ossidasi a funzione mista (45) (46) (47) (48) (49). La frazione S9 viene in generale usata a concentrazioni comprese tra 1-2 % (v/v) ma può aumentare fino al 10 % (v/v) nel terreno di coltura finale. La scelta del tipo e della concentrazione del sistema di attivazione metabolica esogena o dell'induttore metabolico usato può dipendere dalla classe delle sostanze chimiche in esame.

Preparazioni della sostanza chimica in esame

20. Le sostanze chimiche in esame solide devono essere preparate in adeguati solventi e, se necessario, diluite prima del trattamento delle cellule (cfr. il paragrafo 21). Le sostanze chimiche liquide in esame possono essere aggiunte direttamente alla coltura e/o diluite prima del trattamento del sistema di prova. Le sostanze chimiche in esame gassose o volatili devono essere sottoposte alla prova modificando adeguatamente i protocolli standard (trattamento in recipienti di coltura ermetici) (53) (54) (55). Devono essere utilizzati preparati della sostanza chimica approntati immediatamente prima del trattamento, salvo qualora siano disponibili dati sulla sua stabilità che dimostrino che la conservazione è accettabile.

CONDIZIONI DI PROVA

Solventi

21. La scelta del solvente deve favorire l'ottimizzazione della solubilità della sostanza chimica in esame, senza nuocere alla conduzione del metodo di prova (ad esempio influenzando la crescita cellulare), compromettere l'integrità della sostanza chimica in esame, reagire con recipienti di coltura o pregiudicare il sistema di attivazione metabolica. Si raccomanda di prendere in considerazione in primo luogo, se possibile, l'uso di un solvente acquoso (o terreno di coltura). Solventi il cui uso è consolidato sono l'acqua e il dimetilsolfossido. In generale è opportuno che i solventi organici non superino l'1 % (v/v) e quelli acquosi (soluzione fisiologica o acqua) il 10 % (v/v) nel terreno di coltura finale. L'uso di solventi poco noti (ad esempio, etanolo o acetone) è ammesso purché suffragato da dati che ne provino la compatibilità con le sostanze chimiche in esame e l'assenza di tossicità genetica alla concentrazione utilizzata. In assenza di tali dati, è importante includere controlli non trattati (cfr. l'appendice 1, definizioni) per dimostrare che il solvente scelto non induce effetti nocivi o mutageni.

MISURAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ E SCELTA DELLE CONCENTRAZIONI DI TRATTAMENTO

22. Nel determinare la concentrazione più elevata della sostanza chimica in esame, occorre evitare le concentrazioni che hanno la capacità di produrre falsi risultati positivi, come quelle che causano eccessiva citotossicità (cfr. il paragrafo 28), precipitazione nel terreno di coltura (cfr. il paragrafo 29) o variazioni marcate del pH od osmolalità (cfr. il paragrafo 8). Se la sostanza chimica in esame provoca un'alterazione marcata del pH del terreno al momento della sua aggiunta, è possibile adeguare il pH mediante l'azione tampone del terreno di trattamento finale in modo da evitare falsi risultati positivi e da mantenere condizioni di coltura appropriate.

23. La scelta della concentrazione si basa sulla citotossicità e su altre considerazioni (cfr. i paragrafi 27-30). Mentre la valutazione della citotossicità in una prova iniziale può essere utile per definire meglio le concentrazioni da utilizzare nell'esperimento principale, non è necessario condurre una prova iniziale. Anche se si effettua una valutazione iniziale della citotossicità, nella prova principale è ancora richiesta la misurazione della citotossicità di ciascuna coltura. Se si effettuano esperimenti per determinare gli intervalli di dose, essi dovrebbero interessare un'ampia gamma di concentrazioni e possono essere conclusi al giorno 1 dopo il trattamento o proseguiti attraverso l'espressione del giorno 2 e la selezione dei mutanti (se risulta che le concentrazioni utilizzate sono appropriate).

24. La citotossicità va determinata per ciascuna coltura di prova e di controllo: i metodi di prova per le prove MLA (2) e TK6 (15) sono definiti da prassi concordate a livello internazionale.

25. Per entrambe le versioni (gel di agarosio e microtitolazione) della prova MLA: la citotossicità va valutata mediante la crescita relativa totale (RTG), in origine definita da Clive e Spector nel 1975 (2). Questa misurazione include la crescita in sospensione relativa (RSG: coltura di prova e coltura di controllo con solvente) durante il trattamento delle cellule, il tempo di espressione e l'efficienza relativa di clonazione (RCE: coltura di prova e coltura di controllo con solvente) al momento della selezione dei mutanti (2). Va osservato che la RSG include le eventuali perdite di cellule che si verificano nella coltura di prova durante il trattamento (cfr. l'appendice 2 per la formula).

26. Per la prova TK6: la citotossicità va valutata per mezzo del tasso di sopravvivenza relativa (RS), ossia l'efficienza di clonazione delle cellule piastrate subito dopo il trattamento, adeguata per le eventuali perdite di cellule durante il trattamento, in base alla conta cellulare, rispetto ai controlli negativi (assegnata una sopravvivenza del 100 %) (cfr. l'appendice 2 per la formula).

27. Si usino almeno quattro concentrazioni di prova (senza contare i controlli positivi e i controlli con solvente) che soddisfano i criteri di accettabilità (citotossicità adeguata, numero di cellule, ecc.). Sebbene sia consigliabile l'utilizzo di colture doppie, per ciascuna concentrazione di prova si possono utilizzare colture replicate o uniche. I risultati ottenuti con colture replicate con una determinata concentrazione devono essere riportati separatamente ma possono essere aggregati per l'analisi dei dati (55). Per le sostanze chimiche in esame la cui citotossicità è bassa o nulla, sono in generale adeguati intervalli di concentrazione di un fattore di circa 2 a 3. In caso di citotossicità, le concentrazioni di prova selezionate devono coprire l'intervallo di citotossicità a partire dai valori che producono citotossicità come descritto al paragrafo 28 e che include le concentrazioni alle quali si riscontra una citotossicità modesta o nulla. Molte sostanze chimiche in esame presentano curve di concentrazione-risposta a forte pendenza e, per coprire l'intero intervallo di citotossicità o per valutare la concentrazione-risposta in dettaglio, può essere necessario utilizzare concentrazioni più ravvicinate e più di quattro concentrazioni, in particolare nei casi in cui è necessario ripetere l'esperimento (cfr. il paragrafo 70). L'utilizzo di più di quattro concentrazioni può essere particolarmente importante quando si utilizzano colture uniche.

28. Se la concentrazione massima è basata sulla citotossicità, la concentrazione massima deve mirare a realizzare un tasso di RTG compreso fra 20 e 10 % per la prova MLA e un tasso di RS fra 20 e 10 % per la prova TK6 (paragrafo 67).

29. Per le sostanze chimiche in esame scarsamente solubili che non sono citotossiche a concentrazioni inferiori alla concentrazione insolubile più bassa, la concentrazione più elevata analizzata dovrebbe presentare una torbidità o un precipitato visibile ad occhio nudo o con un microscopio invertito alla fine del trattamento con la sostanza chimica in esame. Anche se la citotossicità si verifica a concentrazioni superiori a quella minima insolubile, è indicato effettuare la prova a una sola concentrazione che produce torbidità o un precipitato visibile, perché il precipitato può falsare gli effetti. Poiché le prove MLA e TK6 utilizzano colture in sospensione, che produce un precipitato, occorre assicurarsi in particolare che quest'ultimo non interferisca con la conduzione della sperimentazione. Può essere utile anche valutare la solubilità nel terreno di coltura prima della prova.

30. Se non si osserva una citotossicità limitante o si rileva la presenza di un precipitato, la concentrazione massima di prova dovrebbe essere pari a 10 mM, 2 mg/ml or 2 µl/ml, (si scelga il valore più basso) (57) (58). Quando la composizione della sostanza chimica in esame non è definita, ad esempio nel caso di sostanze di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali biologici (ossia sostanze di composizione sconosciuta o variabile, UVCB), prodotti estratti dall'ambiente, ecc., può essere necessario aumentare la concentrazione massima (ad es. 5 mg/ml) in assenza di citotossicità sufficiente, per aumentare la concentrazione di ciascun componente. Va tuttavia rilevato che tali requisiti possono essere diversi per i prodotti farmaceutici per uso umano (59).

Controlli

31. Per ciascuna condizione di prova si effettuano anche controlli negativi concomitanti (cfr. il paragrafo 21), consistenti nel solo solvente nel terreno di trattamento; i controlli vanno trattati come le colture di trattamento.

32. I controlli positivi concomitanti sono necessari per dimostrare la capacità del laboratorio di individuare mutageni alle condizioni del protocollo di prova, l'efficacia del sistema di attivazione metabolica esogena, se del caso, nonché un'adeguata rilevazione dei mutanti *TK*, sia in piccole colonie/a comparsa tardiva, sia in grandi colonie/a comparsa precoce. Esempi di controlli positivi sono indicati nella tabella 1 in appresso. Sostanze alternative possono essere usate per i controlli positivi, se necessario. Poiché le prove di genotossicità *in vitro* su cellule di mammifero sono sufficientemente standardizzate per i trattamenti concomitanti di breve durata (3-4 ore) effettuati con e senza attivazione metabolica per la stessa durata di trattamento, l'uso dei controlli positivi può essere limitato a un mutageno che richiede attivazione metabolica. In questo caso, questa sola risposta in un controllo positivo dimostrerà sia l'attività del sistema di attivazione metabolica che la capacità di risposta del sistema di prova. Se utilizzato, il trattamento a lungo termine (ossia 24 ore senza S9) richiede tuttavia l'esecuzione di un proprio controllo positivo, in quanto la durata del trattamento differisce da quella della prova con attivazione metabolica. Ciascun controllo positivo va utilizzato con una o più concentrazioni che in generale danno luogo a un aumento riproducibile e individuabile rispetto al valore di fondo per dimostrare la sensibilità del sistema sperimentale e la risposta non può essere compromessa da una citotossicità superiore ai limiti stabiliti nel presente metodo di prova (cfr. il paragrafo 28).

Tabella 1

Sostanze chimiche di riferimento raccomandate per la valutazione della competenza dei laboratori e per la selezione dei controlli positivi

Categoria	Sostanza	N. CAS
1. Mutageni attivi senza attivazione metabolica		
	Metansolfonato di metile	66-27-3
	Mitomicina C	50-07-7
	4-Nitrochinolina-N–ossido	56-57-5
2. Mutageni che richiedono attivazione metabolica		
	Benzo(a)pirene	50-32-8
	Ciclofosfamide (monoidrato)	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-Dimetilbenzantracene	57-97-6
	3-Metilcolantrene	56-49-5

PROCEDURA

Trattamento con la sostanza chimica in esame

33. Le cellule in proliferazione sono trattate con la sostanza chimica in esame in presenza e in assenza di un sistema di attivazione metabolica. L'esposizione deve protrarsi per un periodo adeguato (si considerano di norma adeguate 3-4 ore). Va tuttavia rilevato che tali requisiti possono essere diversi per i prodotti farmaceutici per uso umano (59). Per la prova MLA, nei casi in cui il trattamento di breve durata produca risultati negativi e in assenza di informazioni che indichino l'esigenza di un trattamento più lungo [ad es. analoghi nucleosidici, sostanze chimiche scarsamente solubili, (5) (59)], va presa in considerazione la conduzione della prova con un trattamento più lungo, ossia 24 ore senza S9.

34. Il numero minimo di cellule utilizzate per ciascuna coltura di prova (di controllo e trattate) in ogni fase della prova è basata sulla frequenza dei mutanti spontanei. Un orientamento generale è trattare e preparare sub-colture di un numero sufficiente di cellule per mantenere almeno 10 ma idealmente 100 mutanti spontanei in ciascuna coltura sperimentale in tutte le fasi della prova (trattamento, espressione fenotipica e selezione dei mutanti) (56).

35. Per la prova MLA la frequenza accettabile dei mutanti spontanei raccomandata è compresa fra 35-140 × 10^{-6} (gel di agarosio) e 50-170 × 10^{-6} (microtitolazione) (cfr. tabella 2). Per ottenere almeno 10 e idealmente 100 mutanti spontanei che sopravvivano al trattamento per ciascuna coltura di prova, è necessario trattare almeno 6 × 10^{6} cellule. Trattare questo numero di cellule e mantenere un numero di cellule sufficiente durante l'espressione e la clonazione per la selezione dei mutanti fornisce un numero sufficiente di mutanti spontanei (10 o più) in tutte le fasi della prova, anche per le colture trattate a concentrazioni con il 90 % di citotossicità (misurata da un RTG del 10 %) (19)(38)(39).

36. Per la prova TK6, la frequenza dei mutanti spontanei di norma è compresa fra 2 e 10 × 10^{-6}. Per ottenere almeno 10 mutanti spontanei che sopravvivano al trattamento per ciascuna coltura, è necessario trattare almeno 20 × 10^{6} cellule. Trattare un tale numero di cellule fornisce un numero sufficiente di mutanti spontanei (10 o più) anche per le colture trattate a concentrazioni che causano il 90 % di citotossicità durante il trattamento (RS 10 %). Inoltre durante il periodo di espressione per la selezione dei mutanti va coltivato e piastrato un numero sufficiente di cellule (60).

Tempo dell'espressione fenotipica e misurazione della citotossicità e della frequenza dei mutanti

37. Alla fine del periodo di trattamento le cellule sono coltivate per un tempo definito per consentire l'espressione fenotipica quasi ottimale delle mutazioni neoindotte; specifica di ciascuna linea cellulare. Per la prova MLA, il periodo di espressione fenotipica è di 2 giorni. Per la prova TK6, il periodo di espressione fenotipica è di 3-4 giorni. Se si utilizza un periodo di trattamento di 24 ore, il periodo di espressione inizia alla fine del trattamento.

38. Durante il periodo di espressione fenotipica le cellule sono conteggiate con cadenza giornaliera. Per la prova MLA le conte giornaliere delle cellule sono utilizzate per calcolare la crescita in sospensione quotidiana (SG). In seguito al periodo di espressione di 2 giorni, le cellule sono sospese nel terreno di coltura con e senza agente selettivo per determinare rispettivamente il numero dei mutanti (piastre di selezione) e l'efficienza di clonazione (piastre di vitalità). Per la prova MLA esistono due metodi ugualmente accettabili per clonare la selezione dei mutanti: il primo si avvale del gel di agarosio e l'altro utilizza un terreno di coltura liquido in piastre a 96 pozzetti (19) (38) (39). La clonazione nella prova TK6 è condotta utilizzando terreni di coltura liquidi e piastre a 96 pozzetti (16).

39. La trifluorotimidina (TFT) è l'unico agente selettivo raccomandato per i mutanti *TK* (61).

40. Per la prova MLA, le piastre di agarosio e le piastre di microtitolazione sono sottoposte a conta dopo un'incubazione di 10-12 giorni. Per la prova TK6, le colonie nelle piastre di microtitolazione sono conteggiate dopo 10-14 giorni per i mutanti a comparsa precoce. Al fine di recuperare i mutanti TK6 a crescita lenta (comparsa tardiva), è necessario rialimentare le cellule con terreno di coltura e TFT, previa conta dei mutanti a comparsa precoce e quindi incubare le piastre per 7-10 giorni supplementari (62). Cfr. i paragrafi 42 e 44 per una discussione relativa all'enumerazione dei mutanti *TK* a crescita lenta e normale.

41. Nell'appendice 2 sono riportati i calcoli appropriati per le due prove, compresi i due metodi (gel di agarosio e microtitolazione) per la prova MLA. Per il metodo del gel di agarosio della prova MLA, si conteggiano le colonie e si adegua il numero di mutanti per l'efficienza di clonazione per calcolare una MF. Per la versione a microtitolazione delle prove MLA e TK6, l'efficienza di clonazione di entrambe le piastre di selezione ed efficienza di clonazione è determinata secondo la distribuzione di Poisson (63). La MF è calcolata a partire da queste due efficienze di clonazione.

Caratterizzazione della colonia mutante

42. Per la prova MLA, se la sostanza chimica in esame è positiva (cfr. i paragrafi 62 e 63), la caratterizzazione per dimensione o crescita della stessa deve essere effettuata su almeno una delle colture trattate (in generale quella con la concentrazione positiva più alta) nonché sui controlli negativi e positivi. Se la sostanza chimica in esame è negativa (cfr. il paragrafo 64), la caratterizzazione della colonia mutante va effettuata sui controlli negativi e positivi. Per il metodo della microtitolazione della prova MLA, una piccola colonia di mutanti è definita come quella che copre meno del 25 % del diametro del pozzetto e una grande colonia di mutanti come quella che copre oltre il 25 % del diametro del pozzetto. Per la versione con gel di agarosio, si utilizza un contatore di colonie automatico per conteggiare le colonie di mutanti e determinare la dimensione della colonia. Gli approcci alla determinazione della dimensione della colonia sono illustrati in dettaglio nella letteratura scientifica (19)(38)(40). La caratterizzazione della colonia nei controlli negativi e positivi è necessaria per dimostrare che gli studi sono stati adeguatamente condotti.

43. La sostanza chimica in esame non può essere determinata come negativa se i mutanti di entrambe le colonie, grandi e piccole, non sono adeguatamente rilevati nel controllo positivo. La caratterizzazione della colonia può essere utilizzata per ottenere informazioni generali relative alla capacità della sostanza chimica in esame di indurre mutazioni puntiformi e/o fenomeni cromosomici (paragrafo 4).

44. TK6: i mutanti a crescita normale e lenta si differenziano per il tempo di incubazione (cfr. il paragrafo 40). Per la prova TK6 in generale si conteggiano sia i mutanti a comparsa precoce, sia quelli a comparsa tardiva, per tutte le colture, compresi i controlli negativi e positivi. La caratterizzazione della colonia nei controlli negativi e positivi è necessaria per dimostrare che gli studi sono stati adeguatamente condotti. La sostanza chimica in esame non può essere determinata come negativa se i mutanti di entrambe le colonie a comparsa precoce e tardiva non sono adeguatamente rilevati nel controllo positivo. La caratterizzazione della colonia può essere utilizzata per ottenere informazioni generali relative alla capacità della sostanza chimica in esame di indurre mutazioni puntiformi e/o fenomeni cromosomici (paragrafo 4).

Competenza del laboratorio

45. Al fine di dimostrare una sufficiente esperienza con un metodo di prova prima di utilizzarlo regolarmente, il laboratorio deve aver effettuato una serie di esperienze con sostanze di riferimento positive che agiscono mediante meccanismi differenti (almeno una con attivazione metabolica e una senza attivazione metabolica, con sostanze selezionate dalle sostanze chimiche elencate nella tabella 1) e con vari controlli negativi (comprese colture non trattate e diversi solventi/mezzi disperdenti). Le risposte dei controlli positivi e negativi devono essere coerenti con la letteratura scientifica. Questo requisito non si applica ai laboratori che hanno già maturato un'esperienza, vale a dire che dispongono di una banca di dati storici quale definita ai paragrafi 47-50. Per la prova MLA, i valori ottenuti per i controlli negativi e positivi devono essere coerenti con le raccomandazioni dell'*International Workshop on Genotoxicity Testing* (IWGT) (cfr. tabella 2).

46. Una selezione di sostanze chimiche utilizzate come sostanze di controllo positivo (cfr. tabella 1) deve essere verificata con trattamenti di breve e lunga durata (se si utilizzano trattamenti lunghi) in assenza attivazione metabolica, e anche con trattamenti brevi in presenza di attivazione metabolica, allo scopo di dimostrare che il laboratorio dispone della competenza necessaria per individuare le sostanze chimiche mutagene, determinare l'efficacia del sistema di attivazione metabolica e dimostrare l'adeguatezza delle condizioni di crescita delle cellule durante il trattamento, l'espressione fenotipica e la selezione dei mutanti nonché dei metodi di conteggio. Occorrerà definire un intervallo di concentrazione delle sostanze selezionate che consenta di ottenere aumenti riproducibili e correlati alla concentrazione rispetto ai valori di fondo allo scopo di dimostrare la sensibilità e l'intervallo dinamico del sistema di prova.

Dati storici di controllo

47. Il laboratorio deve stabilire:

— un intervallo e una distribuzione dei controlli positivi storici;

— un intervallo e una distribuzione dei controlli negativi storici (non trattati, con solvente).

48. Al momento della prima acquisizione di dati per stabilire la distribuzione dei controlli negativi storici, i dati dei controlli negativi concomitanti devono essere coerenti con i dati pubblicati. Con l'aumento dei dati sperimentali aggiunti alla distribuzione dei controlli, i controlli negativi concomitanti dovrebbero idealmente situarsi entro i limiti di tale controllo al 95 % di tale distribuzione (64) (65).

49. La banca dati dei controlli negativi storici del laboratorio deve inizialmente essere costituita con un minimo di 10 esperimenti ma preferibilmente con almeno 20 esperimenti svolti in condizioni sperimentali analoghe. I laboratori devono utilizzare metodi di controllo della qualità, quali diagrammi di controllo (ad esempio carte C o carte X medio (65)), per rilevare la variabilità dei loro dati di controllo positivi e negativi e dimostrare che la metodologia è "sotto controllo" nel laboratorio (66). Ulteriori dettagli e raccomandazioni su come sviluppare e utilizzare i dati storici sono reperibili nella letteratura scientifica (64).

50. I dati dei controlli negativi consistono nelle frequenze di mutanti da un'unica coltura o preferibilmente da colture replicate, come descritto al paragrafo 27. I controlli negativi concomitanti dovrebbero idealmente situarsi entro i limiti di tale controllo al 95 % della distribuzione della banca dati dei controlli negativi storici del laboratorio. Se i dati dei controlli negativi si situano al di fuori del limite di controllo al 95 %, la loro inclusione nella distribuzione dei controlli storici può essere accettata a condizione che tali dati non siano valori erratici estremi, che sia provato che il sistema di prova è "sotto controllo" (cfr. il paragrafo 49) e che non vi sono stati problemi tecnici o errori umani.

51. Qualsiasi modifica del protocollo sperimentale deve essere valutata in termini di coerenza dei dati con le banche dati storiche esistenti del laboratorio. Eventuali notevoli incoerenze devono tradursi nella creazione di una nuova banca dati storica sui controlli.

DATI E RELAZIONE

Presentazione dei risultati

52. La presentazione dei dati per entrambe le prove MLA e TK6 deve includere, sia per le colture trattate che per quelle di control4lo, i dati necessari ai fini del calcolo della citotossicità (rispettivamente RTG o RS) e le frequenze dei mutanti, come indicato oltre.

53. Per la prova MLA, per ciascuna coltura si indicano i dati relativi ai tassi RSG, RTG, l'efficienza di clonazione al momento della selezione dei mutanti e il numero di colonie di mutanti (gel di agarosio) o il numero di pozzetti vuoti (microtitolazione). La MF deve essere espressa come il numero delle cellule mutanti per milione di cellule sopravvissute. Se la risposta è positiva, per almeno una concentrazione della sostanza chimica in esame (in generale la concentrazione positiva più elevata) si indicano le MF delle colonie piccole e grandi (e/o la percentuale della MF totale) nonché i controlli negativi e positivi. In caso di risposta negativa, si indicano le MF delle colonie piccole e grandi per i controlli nativi e positivi.

54. Per la prova TK6, per il tasso di RS si indicano i dati relativi a ciascuna coltura, l'efficienza di clonazione al momento della selezione dei mutanti e il numero di pozzetti vuoti per i mutanti a comparsa precoce e quelli a comparsa tardiva. La MF va espressa come numero di cellule mutanti per numero di cellule sopravvissute e include la MF totale nonché la MF (e/o la percentuale della MF totale) dei mutanti a comparsa precoce e tardiva.

Criteri di accettabilità

55. Per entrambe le prove MLA e TK6, i seguenti criteri devono essere soddisfatti prima di determinare i risultati complessivi di una specifica sostanza chimica in esame:

— sono state applicate due condizioni sperimentali (trattamento di breve durata con e senza attivazione metabolica, cfr. il paragrafo 33), salvo nel caso in cui una sia abbia prodotto risultati positivi.

— Deve essere possibile analizzare un numero adeguato di cellule e concentrazioni (cfr. i paragrafi 27, 34-36).

— I criteri di selezione della concentrazione massima sono coerenti con quelli descritti ai paragrafi 28-30.

Criteri di accettabilità per i controlli positivi e negativi

56. L'analisi del gruppo di lavoro di esperti MLA dell'IWGT condotta su un'ingente mole di dati MLA ha permesso di raggiungere il consenso internazionale relativamente ai criteri specifici di accettabilità della prova MLA (1)(2)(3)(4)(5). Il presente metodo di prova fornisce pertanto raccomandazioni specifiche per determinare l'accettabilità dei controlli negativi e positivi nonché per valutare i risultati della singola sostanza nella prova MLA. La prova TK6 dispone di una banca dati molto più ristretta e non è stata sottoposta alla valutazione di un gruppo di lavoro.

57. Per la prova MLA, in ciascuna sperimentazione si valuta se il controllo non trattato/con solvente soddisfa i criteri di accettazione del gruppo di lavoro MLA dell'IWGT ((4) e tabella 2, oltre) relativamente a: 1) MF (si osservi che i valori MF ritenuti accettabili dall'IWGT sono diversi per le versioni con gel di agarosio e microtitolazione della prova MLA), 2) l'efficienza di clonazione (CE) al momento della selezione dei mutanti e 3) la crescita in sospensione (SG) per il controllo con solvente (cfr. l'appendice 2 per le formule).

Tabella 2

Criteri di accettabilità per la prova MLA

Parametro	Metodo del gel di agarosio	Metodo della microtitolazione
Frequenza dei mutanti	$35 - 140 \times 10^{-6}$	$50 - 170 \times 10^{-6}$
Efficienza di clonazione	65 – 120 %	65 – 120 %
Crescita in sospensione	Fattore 8 – 32 (trattamento di 3-4 ore) Fattore 32 – 180 (trattamento di 24 ore, se effettuato)	Fattore 8 – 32 (trattamento di 3-4 ore) Fattore 32 – 180 (trattamento di 24 ore, se effettuato)

58. Per la prova MLA, ciascuna prova deve anche valutare se il o i controlli positivi soddisfano almeno uno dei due criteri di accettazione elaborati dal gruppo di lavoro dell'IWGT:

— il controllo positivo deve dimostrare un incremento assoluto della MF totale, ossia un incremento superiore ai mutanti spontanei di fondo [MF indotta, IMF] di almeno 300×10^{-6}. Almeno il 40 % dell'IMF deve rispecchiarsi nella MF della piccola colonia.

— Il controllo positivo presenta un incremento di MF nella piccola colonia di almeno 150×10^{-6} rispetto a quanto osservato nel controllo concomitante non trattato/con solvente (IMF della piccola colonia pari a 150×10^{-6}).

58. Per una prova TK6, la prova è ritenuta accettabile se il controllo negativo concomitante è considerato accettabile per essere aggiunto nella banca dati sui controlli negativi storici di laboratorio come descritto ai paragrafi 48-49. Inoltre, i controlli positivi concomitanti (cfr. il paragrafo 32) devono produrre risposte compatibili con quelle generate nella banca dati dei controlli positivi storici e produrre un aumento statisticamente significativo rispetto al controllo negativo concomitante.

60. Per entrambe le prove il limite superiore della citotossicità osservata nella coltura di controllo positiva deve essere uguale a quello delle colture sperimentali, ossia, il tasso RTG/RS non deve essere inferiore al 10 %. È sufficiente utilizzare una concentrazione unica (o una delle concentrazioni delle colture di controllo positivo se si utilizza più di una concentrazione) per dimostrare che i criteri di accettazione del controllo positivo sono soddisfatti. Inoltre, la MF del controllo positivo deve situarsi nell'intervallo accettabile stabilito per il laboratorio.

Analisi e interpretazione dei risultati

61. Per la prova MLA, il gruppo di lavoro *Mouse Lymphoma Expert* dell'IWGT ha condotto un importante lavoro sulla rilevanza biologica e i criteri di risposta positiva (4). Pertanto il presente metodo di prova fornisce raccomandazioni specifiche per interpretare i risultati della prova MLA sulla sostanza chimica (cfr. i paragrafi 62-64). La prova TK6 dispone di una banca dati molto più ristretta e non è stata sottoposta alla valutazione di un gruppo di lavoro. Le raccomandazioni per interpretare i dati della prova TK6 sono quindi fornite in termini più generali (cfr. i paragrafi 65-66). Le raccomandazioni supplementari si applicano a entrambe le prove (cfr. i paragrafi 67-71).

MLA

62. Si raccomanda di adottare un approccio volto a definire le risposte positive e negative per assicurare che l'incremento della MF sia biologicamente rilevante. Anziché l'analisi statistica utilizzata in generale per altre prove, esso si fonda sull'uso di una frequenza dei mutanti indotta (ossia un incremento della MF superiore al controllo concomitante) predefinita, designata come "fattore di valutazione globale" (*Global Evaluation Factor*, GEF) e basata sull'analisi della distribuzione dei dati relativi alla MF del controllo negativo ottenuti dai laboratori partecipanti (4). Per la versione con gel di agarosio della prova MLA, il GEF è 90×10^{-6} e per la versione con microtitolazione della prova MLA il GEF è 126×10^{-6}.

63. A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è considerata chiaramente positiva se, in una qualsiasi delle condizioni sperimentali esaminate (cfr. il paragrafo 33), l'incremento della MF superiore al fondo concomitante è superiore al valore GEF e l'incremento è correlato alla concentrazione (ad es. mediante un test di tendenza). La sostanza chimica in esame è quindi ritenuta in grado di indurre mutazioni nel sistema di prova.

64. A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è considerata chiaramente negativa se, in una qualsiasi delle condizioni sperimentali esaminate (cfr. il paragrafo 33), non risulta una risposta correlata alla concentrazione o se l'incremento della MF non è superiore al valore GEF. La sostanza chimica in esame è quindi ritenuta non in grado di indurre mutazioni nel sistema di prova.

TK6

65. A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è considerata chiaramente positiva se, in una qualsiasi delle condizioni sperimentali esaminate (cfr. il paragrafo 33):

— almeno una delle concentrazioni di prova presenta un aumento statisticamente significativo rispetto al controllo negativo concomitante;

— un metodo adeguato di analisi della tendenza evidenzia che l'aumento è collegato alla dose (cfr. il paragrafo 33);

— vi sono risultati che non rientrano nella distribuzione dei dati dei controlli negativi storici (ad esempio limite di controllo al 95 % di una distribuzione di Poisson; cfr. il paragrafo 48).

Se tutti i criteri sono soddisfatti, la sostanza chimica in esame è ritenuta in grado di indurre mutazioni nel sistema di prova. Raccomandazioni relative ai metodi statistici più appropriati figurano nella letteratura scientifica (66) (67).

66. A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è considerata chiaramente negativa se, in tutte le condizioni sperimentali esaminate (cfr. il paragrafo 33):

— nessuna delle concentrazioni sperimentali presenta un incremento statisticamente significativo rispetto al concomitante controllo negativo;

— un test di tendenza appropriato dimostra che non vi è aumento correlato alla concentrazione;

— tutti i risultati si situano entro la distribuzione dei dati di controllo negativi storici (ad es. limite del controllo al 95 % in base alla distribuzione di Poisson, cfr. il paragrafo 48).

La sostanza chimica in esame è quindi ritenuta non in grado di indurre mutazioni nel sistema di prova.

Per entrambe le prove MLA e TK6:

67. se la concentrazione massima è basata sulla citotossicità, la concentrazione più elevata dovrebbe mirare a realizzare un tasso di RTG/RS compreso fra 20 e 10 %. Opinione prevalente è che occorre prestare un'attenzione particolare nell'interpretare i risultati positivi ottenuti solo a un tasso di RTG/RS compreso fra il 20 e il 10 % e che un risultato non sarebbe considerato positivo se l'incremento della MF si verificasse solo a un tasso di RTG/RS del 10 % o inferiore (se valutato) (2)(59).

68. In talune circostanze le informazioni supplementari possono contribuire a determinare se una sostanza chimica in esame non sia mutagena nel caso in cui non vi siano colture che presentano un tasso di RTG/RS compreso fra il 10 e il 20 %. Tali situazioni sono delineate come segue. 1) Non vi sono prove di mutagenicità (ad es. nessuna risposta alla dose, nessuna frequenza dei mutanti superiore a quelle osservate nei controlli negativi concomitanti o negli intervalli storici di fondo, ecc.) in una serie di dati puntuali del tasso di RTG/RS compresi fra il 100 e il 20 % con almeno un dato puntuale del tasso di RTG/RS compreso fra il 20 e il 25 %. 2) Non vi sono prove di mutagenicità (ad es. nessuna risposta alla dose, nessuna frequenza dei mutanti superiore a quelle osservate nei controlli negativi concomitanti o negli intervalli storici di fondo, ecc.) in una serie di dati puntuali del tasso di RTG/RS situati fra il 100 e il 25 % e si registra anche un dato puntuale del tasso di RTG/RS negativo lievemente inferiore al 10 %. In entrambe le situazioni si può concludere che la sostanza in esame è negativa.

69. Non è necessario verificare una risposta palesemente positiva o negativa.

70. Se la risposta non è chiaramente negativa o positiva, come descritto in precedenza, e/o al fine di contribuire a stabilire la rilevanza biologica di un risultato, i dati devono venire sottoposti al giudizio di esperti e/o a indagini più approfondite. Può essere utile ripetere un esperimento modificandone eventualmente le condizioni (ad esempio, intervallazione delle concentrazioni per aumentare la probabilità di raggiungere i dati puntuali situati nell'intervallo del tasso di RTG/RS compreso fra il 10 e il 20 %, altre condizioni di attivazione metabolica (ossia concentrazione S9 o di origine S9) e durata del trattamento].

71. In rari casi, anche dopo ulteriori analisi, la serie di dati non consente di valutare i risultati come positivi o negativi. Pertanto la risposta della sostanza chimica in esame va considerata equivoca (interpretata come altrettanto positiva o negativa).

RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DELLA PROVA

72. La relazione sull'esecuzione della prova comprende le informazioni riportate di seguito.

Sostanza chimica in esame:

— origine, numero di lotto e data di scadenza, se disponibile;

— stabilità della sostanza chimica in esame, se nota;

— solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente, se note;

— misurazione del pH, dell'osmolalità e del precipitato nel terreno di coltura al quale è stata aggiunta la sostanza chimica in esame, se del caso.

Sostanza monocostituente:

— aspetto fisico, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche;

— identificazione chimica, come la denominazione IUPAC o CAS, il numero CAS, il codice SMILES o InChI, la formula strutturale, la purezza, l'identità chimica delle impurezze, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc.

Sostanza multicostituente, UVCB e miscele:

— caratterizzate nella massima misura possibile con l'identità chimica (vedasi sopra), con la presenza quantitativa e con le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti.

Solvente:

— giustificazione della scelta del solvente;

— percentuale di solvente nel terreno di coltura finale.

Cellule:

Per le colture madri di laboratorio:

— tipo e provenienza delle cellule nonché dati storici del laboratorio che esegue la prova;

— caratteristiche del cariotipo e/o numero modale di cromosomi;

— metodi usati per il mantenimento delle colture cellulari;

— assenza di micoplasma;

— tempi di raddoppiamento delle cellule.

Condizioni sperimentali:

— criteri di selezione delle concentrazioni e del numero di colture cellulari: ad esempio i dati relativi alla citotossicità e ai limiti di solubilità;

— composizione dei terreni di coltura, concentrazione di CO_2, livello di umidità;

— concentrazione della sostanza chimica in esame espressa come concentrazione finale nel terreno di coltura (ad esempio µg o mg/ml o mM di terreno di coltura);

— concentrazione (e/o volume) del solvente e della sostanza chimica in esame aggiunti nel terreno di coltura;

— temperatura di incubazione;

— tempo di incubazione;

— durata del trattamento;

— densità delle cellule durante il trattamento;

— tipo e composizione del sistema di attivazione metabolica (fonte di S9, metodo di preparazione della miscela S9, concentrazione o volume della miscela S9 e di S9 nel terreno di coltura finale, controlli di qualità S9);

— sostanze di controllo positive e negative, concentrazioni finali per ciascuna condizione di trattamento;

— durata del periodo di espressione (con numero di cellule inseminate, sub-colture e protocolli di alimentazione, se del caso);

— identità e concentrazione dell'agente selettivo;

— per la prova MLA, si indica la versione utilizzata (gel di agarosio o microtitolazione)

— criteri di accettabilità delle prove;

— metodi usati per contare il numero di cellule vitali e mutanti;

— metodi utilizzati per la misurazione della citotossicità;

— eventuali informazioni supplementari pertinenti per la citotossicità e metodo utilizzato;

— durata dei tempi di incubazione dopo la piastratura;

— definizione delle colonie considerate, per dimensione e tipo (compresi i criteri in base a cui le colonie sono considerate "piccole" o "grandi", se del caso).

— criteri in base ai quali i risultati sono considerati positivi, negativi o ambigui;

— metodi utilizzati per determinare il pH, l'osmolalità e la precipitazione, se del caso.

Risultati:

— numero di cellule trattate e numero di cellule sottoposte a sub-coltura per ciascuna coltura;

— parametri di tossicità (tasso di RTG per MLA e di RS per TK6);

— segni di precipitazione e momento della determinazione;

— numero di cellule piastrate nel terreno di coltura selettivo e in quello non selettivo;

— numero di colonie nel terreno di coltura non selettivo e numero di colonie resistenti in quello selettivo e relative frequenze dei mutanti;

— dimensione delle colonie per i controlli negativi e positivi e, se la sostanza chimica in esame è positiva, almeno una concentrazione nonché le relative frequenze dei mutanti;

— relazione concentrazione-risposta, se possibile;

— dati sui controlli concomitanti negativi (solvente) e positivi (concentrazioni e solventi);

— dati sui controlli storici negativi (solvente) e positivi (concentrazioni e solventi), con intervalli, medie e deviazioni standard; numero di prove su cui si basano i controlli storici;

— analisi statistiche (per le colture singole e le repliche raggruppate se del caso), e gli eventuali valori-p; e per la prova MLA, la valutazione GEF.

Discussione dei risultati

Conclusione

BIBLIOGRAFIA

(1) Moore, M.M., Honma, M. Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185-190.

(2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292-299.

(3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127-140.

(4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1-5.

(5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36-40.

(6) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

(7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): 21-28.

(8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1-2): 101-114.

(9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol*. Sci.., 109 (1): 96-105.

(10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. Sci. USA, 87 (1): 51-55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169-181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237-242.

(13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151 (1): 161-174.

(14) Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): 143-153.

(15) Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): 77-87.

(16) Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): 89-98.

(17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203-14.

(18) Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. Mutation Res., 267 (1): 89-95.

(19) Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ −3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.

(20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. and Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634 (1-2): 177-183.

(21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439-452.

(22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): 879-886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): 297-305.

(24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257: 147-204.

(25) Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. Mutation Res., 626 (1-2): 185-190.

(26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: 673-680.

(27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): 61-108.

(28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243-253.

(29) Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181-193.

(30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$−3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127-131.

(31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+}/^{-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): 35-42.

(32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation. Res., 373 (2): 157-165.

(33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Mutagen., 19 (4): 263-268.

(34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84 (2): 411–416.

(35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45 (2-3): 162-176.

(36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. Cancer. Res., 55 (1): 12-15.

(37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in preparation).

(38) Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.

(39) Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. In: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z and Caldwell(Eds), 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): 467-485.

(41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA, 33 (3): 261-287.

(42) Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4-5): 287-294.

(43) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31 (6): 347-364.

(44) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173-215.

(45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37 (1): 83-90.

(46) Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66 (3): 277-290.

(47) Ong T.M., *et al.* (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 (1): 55-65

(48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen., 7 (3): 175-177.

(49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): 241-261.

(51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28 (1): 51-59.

(52) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP).

(53) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L.and Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, pp. 91-103.

(54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5 (6): 795-801.

(55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122-130.

(56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(57) Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32-56.

(58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36-43.

(59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Consultabile al seguente indirizzo: [https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].

(60) Honma M. and Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373-384.

(61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient ($TK^{-/-}$) Mutants from L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363-378.

(62) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9-17.

(63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): 1-8.

(64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87-90.

(65) Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.

(66) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 199.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(67) Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Appendice 1

DEFINIZIONI

Aneugeno: detto di qualsiasi sostanza chimica o processo che, interagendo con le componenti del ciclo mitotico e meiotico di divisione cellulare, determina aneuploidia nelle cellule o negli organismi.

Aneuploidia: qualsiasi deviazione dal normale numero diploide (o aploide) di cromosomi da parte di uno o più cromosomi, ma non dell'intero corredo di cromosomi (poliploidia).

Mutageni che provocano la sostituzione di coppie di basi: sostanze che provocano la sostituzione di una o più coppie di basi del DNA.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Efficienza di clonazione: percentuale di cellule piastrate a bassa densità in grado di crescere in una colonia che può essere contata.

Clastogeno: qualsiasi sostanza chimica o processo in grado di provocare aberrazioni cromosomiche strutturali in popolazioni di cellule o organismi.

Citotossicità: per le prove di cui al presente metodo di prova, la citotossicità è identificata come riduzione della crescita relativa totale (RTG) o della sopravvivenza relativa (RS), rispettivamente per le prove MLA e TK6.

Mutazione "in avanti": una mutazione genica in cui dal tipo parentale alla forma mutante si ha alterazione o perdita dell'attività enzimatica o della funzione della proteina codificata.

Mutageni che provocano la mutazione della fase di lettura: sostanze chimiche che provocano l'inserzione o la delezione di una o più coppie di basi nella molecola di DNA.

Genotossico: termine generico che comprende tutti i tipi di danno a carico del DNA o dei cromosomi, tra cui rottura del DNA, cancellazioni, riarrangiamenti, mutazioni, aberrazioni cromosomiche e aneuploidia. Non tutti i tipi di effetti genotossici determinano alterazioni cromosomiche o danni permanenti ai cromosomi.

Ricombinazione mitotica: durante la mitosi, ricombinazione fra cromatidi omologhi risultanti nell'eventuale induzione di rotture del doppio filamento del DNA o in una perdita di eterozigosi.

Mutageno: un fattore in grado di provocare mutazioni ereditarie della o delle sequenze di coppie di basi del DNA nei geni o della struttura dei cromosomi (aberrazioni cromosomiche).

Frequenza dei mutanti (MF): numero di cellule mutanti diviso per il numero di cellule vitali.

Tempo di espressione fenotipica: il tempo trascorso dal trattamento durante il quale l'alterazione genetica si fissa nel genoma e tutti i prodotti genici preesistenti scompaiono fino all'alterazione del tratto fenotipico.

Tasso di sopravvivenza relativa (RS): il tasso di RS è utilizzato come misura della citotossicità del trattamento nella prova TK6. Si tratta dell'efficienza di clonazione (CE) delle cellule piastrate subito dopo il trattamento, adeguata per le eventuali perdite di cellule durante il trattamento, rispetto all'efficienza di clonazione nei controlli negativi.

Crescita in sospensione relativa (RSG): per la prova MLA, la crescita totale relativa di due giorni in sospensione della coltura sperimentale rispetto alla crescita totale di due giorni in sospensione del controllo negativo/con solvente (Clive e Spector, 1975). Il tasso di RSG include la crescita relativa della coltura sperimentale rispetto al controllo negativo/con solvente durante il periodo di trattamento.

Crescita relativa totale (RTG): il tasso di RTG è utilizzato come misura della citotossicità del trattamento nella prova MLA. È una misura della crescita relativa (del controllo con mezzo disperdente) delle colture sperimentali durante le fasi di trattamento, di espressione di due giorni e di clonazione della selezione dei mutanti della prova. Il tasso di RSG di ciascuna coltura sperimentale è moltiplicato per l'efficienza di clonazione relativa della coltura sperimentale al momento della selezione dei mutanti ed espressa in relazione all'efficienza di clonazione del controllo negativo/con solvente (Clive and Spector, 1975).

Frazioni S9 di fegato: supernatante dell'omogenato di fegato centrifugato a 9 000 g (estratto di fegato crudo).

Miscela di frazione S9: miscela di frazione S9 di fegato e dei cofattori necessari all'attività degli enzimi metabolici.

Crescita in sospensione (SG): fattore di incremento del numero di cellule durante le fasi di trattamento ed espressione della prova MLA. Il valore di SG è calcolato moltiplicando l'aumento del giorno 1 per l'aumento del giorno 2 nel trattamento di breve durata (3-4 ore). Se si applica un trattamento di 24 ore, il valore di SG è pari all'aumento durante le 24 ore di trattamento moltiplicato per l'aumento dei giorni di espressione 1 e 2.

Controllo con solvente: termine generico che designa le colture di controllo che ricevono unicamente il solvente utilizzato per dissolvere la sostanza chimica in esame.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata applicando il presente metodo di prova.

Controllo non trattato: i controlli non trattati sono colture non sottoposte a trattamento (che non ricevono alcuna sostanza chimica in esame né solvente) ma preparate in modo identico alle culture esposte alla sostanza chimica in esame.

Appendice 2

FORMULE

Citotossicità

Per entrambe le versioni (gel di agarosio e microtitolazione) della prova MLA

La citotossicità è definita come la crescita relativa totale (RTG) che comprende la crescita in sospensione relativa (RSG) durante il periodo di espressione di 2 giorni e l'efficienza di clonazione relativa (RCE) ottenuta al momento della selezione dei mutanti. I tassi di RTG, RSG e RCE sono tutti espressi come percentuali.

Calcolo del tasso di RSG: la crescita in sospensione 1 (SG_1) corrisponde al tasso di crescita fra il giorno 0 e il giorno 1 (concentrazione delle cellule il giorno 1 / concentrazione delle cellule il giorno 0) e la crescita in sospensione 2 (SG_2) corrisponde al tasso di crescita fra il giorno 1 e il giorno 2 (concentrazione delle cellule il giorno 2 / concentrazione delle cellule il giorno 1). Il tasso di RSG corrisponde al valore totale di SG (SG_1 x SG_2) della coltura trattata rispetto al controllo non trattato/con solvente. Ossia: RSG = $[SG_{1(test)}$ x $SG_{2(test)}]$ / $[SG_{1(control)}$ x $SG_{2(control)}]$ Il valore di SG_1 va calcolato a partire dalla concentrazione delle cellule iniziale utilizzata all'inizio del trattamento delle stesse. Questo spiega un'eventuale citotossicità differenziale che si verifica nella o nelle colture sperimentali durante il trattamento delle cellule.

Il tasso di RCE corrisponde all'efficienza di clonazione relativa della coltura sperimentale rispetto all'efficienza di clonazione relativa del controllo non trattato/con solvente ottenuta al momento della selezione dei mutanti.

Crescita relativa totale (RTG): RTG=RSG x RCE

TK6

Tasso di sopravvivenza relativa (RS)

La citotossicità è valutata mediante il tasso di sopravvivenza relativa, ossia l'efficienza di clonazione (CE) delle cellule piastrate subito dopo il trattamento, adeguata per le eventuali perdite di cellule durante il trattamento, rispetto all'efficienza di clonazione nei controlli negativi (cui è assegnata una sopravvivenza del 100 %). L'adeguamento per la perdita di cellule durante il trattamento è calcolato come:

$$\text{CE adattata} = \text{CE} \times \frac{\textit{Numero di cellule alla fine del trattamento}}{\textit{Numero di cellule all'inizio del trattamento}}$$

Il tasso di RS per una coltura trattata con una sostanza chimica in esame è calcolato come:

$$RS = \frac{\textit{CE adattata nella coltura trattatae}}{\textit{CE adattata nel controllo con solvente}} \times 100$$

Frequenza dei mutanti per entrambe le prove MLA e TK6

La frequenza dei mutanti (MF) è l'efficienza di clonazione delle colonie mutanti nel terreno di coltura selettivo (CE_M) adattato per l'efficienza di clonazione nel terreno non selettivo al momento della selezione (CE_V). Ossia $MF=CE_M/CE_V$. Il calcolo di queste due efficienze di clonazione è descritto oltre per i metodi di clonazione con gel di agarosio e microtitolazione.

MLA, versione gel di agarosio: nella versione della prova MLA con gel di agarosio, il numero di colonie sulla piastra di selezione dei mutanti (C_M) e il numero di colonie presenti su quella non selezionata o destinata a misurare l'efficienza di clonazione (conta della vitalità) (C_V) sono ottenuti mediante conteggio diretto dei cloni. Se si piastrano 600 cellule ai fini dell'efficienza di clonazione (CE), le piastre utilizzate per la selezione dei mutanti (CE_M) e le piastre non selezionate o destinate a misurare l'efficienza di clonazione (conta della vitalità) (CE_V) e che per la selezione dei mutanti si usano 3 x 10^6 cellule,

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

MLA e TK6, versione a microtitolazione: nella versione a microtitolazione della prova MLA, i valori C_M e C_V sono determinati come il prodotto del numero totale di pozzetti (TW) e il numero probabile di colonie per pozzetto (P) sulle piastre di microtitolazione.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Dal termine zero della distribuzione di Poisson (Furth *et al.*, 1981), P è dato da

$$P = - \ln (EW / TW)$$

Dove EW è il numero di pozzetti vuoti e TW è il numero totale di pozzetti. Quindi,

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

Per la versione a microtitolazione della prova MLA, le frequenze dei mutanti delle colonie piccole e grandi si calcolano in modo identico, utilizzando il pertinente numero di pozzetti vuoti per le colonie piccole e grandi.

Per la prova TK6 le frequenze di mutanti delle colonie piccole e grandi sono basate sulla comparsa precoce e tardiva dei mutanti.

B.68 **METODO DI PROVA DI EPOSIZIONE IN VITRO DI BREVE DURATA PER L'IDENTIFICAZIONE DI i) SOSTANZE CHIMICHE CHE INDUCONO GRAVI LESIONI OCULARI E ii) SOSTANZE CHIMICHE CHE NON RICHIEDONO CLASSIFICAZIONE PER IRRITAZIONE OCULARE O GRAVI LESIONI OCULARI**

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 491 (2017). L'esposizione di breve durata (STE, *Short Time Exposure*) è un metodo di prova *in vitro* che può essere utilizzato, in determinate circostanze e con specifiche limitazioni, per la classificazione delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) come sostanze pericolose che inducono gravi lesioni oculari e come sostanze che non richiedono classificazione per irritazione oculare o gravi lesioni oculari, secondo la definizione del Sistema mondiale armonizzato di classificazione e di etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* (GHS) (1) e del regolamento (CE) n. 1272/2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele (CLP, *Classification, Labelling, Packaging*) ([1]).

2. Da molti anni il potenziale di pericolo che una sostanza chimica rappresenta per gli occhi è valutato usando principalmente la prova *in vivo* sugli occhi del coniglio (metodo B.5 (8), equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 405). È generalmente riconosciuto che nel prossimo futuro non sarà disponibile alcuna prova alternativa *in vitro* che da sola possa sostituire completamente la prova oculare *in vivo* sul coniglio per prevedere tutte le risposte rientranti nella gamma delle lesioni oculari gravi/irritazione oculare indotte dalle diverse classi chimiche. Non è tuttavia da escludere che la prova oculare sul coniglio (2) possa essere sostituita da combinazioni strategiche di metodi alternativi nell'ambito di una strategia sperimentale (sequenziale). L'approccio "dall'alto" è indicato quando, in base alle informazioni esistenti, si prevede che la sostanza chimica abbia un elevato potenziale di irritazione o induca gravi lesioni oculari, mentre l'approccio "dal basso" è appropriato per le sperimentazioni in cui, in base alle informazioni esistenti, si può prevedere che la sostanza chimica non causi un'irritazione oculare tale da richiedere la classificazione. Sebbene considerato inadeguato a sostituire completamente la prova oculare *in vivo* sul coniglio, il metodo STE può però inserirsi validamente in una strategia di prove in sequenza per la classificazione e l'etichettatura a fini regolamentari, come l'approccio "dall'alto"/"dal basso", per individuare senza ulteriore sperimentazione: i) le sostanze chimiche che inducono gravi lesioni oculari (categoria 1 del GHS dell'ONU/CLP), e ii) le sostanze chimiche (escluse quelle altamente volatili e tutte quelle solide diverse dai tensioattivi) che non richiedono classificazione per irritazione oculare o gravi lesioni oculari ("senza categoria" del GHS dell'ONU/CLP) (1)(2). Tuttavia, la sostanza chimica che con il metodo STE non risulta causare gravi lesioni oculari (categoria 1 del GHS dell'ONU/CLP) né rientrare in alcuna classificazione ("senza categoria" del GHS dell'ONU/CLP) deve essere sottoposta a ulteriore sperimentazione per stabilire la classificazione definitiva. Occorre inoltre consultare le autorità di regolamentazione competenti prima di utilizzare il metodo STE in un approccio "dal basso" nell'ambito di sistemi di classificazione diversi dal sistema GHS dell'ONU/CLP. La scelta del metodo di prova più adatto e l'uso del presente metodo devono essere valutati nel contesto del documento di orientamento dell'OCSE *Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation* (14).

3. Scopo del presente metodo di prova è descrivere le procedure impiegate per valutare il pericolo potenziale che la sostanza chimica in esame presenta per l'occhio, sulla base della capacità della sostanza di indurre citotossicità in una prova di esposizione di breve durata. L'effetto citotossico delle sostanze chimiche sulle cellule epiteliali corneali è un meccanismo d'azione importante che provoca lesioni dell'epitelio corneale e irritazione oculare. La vitalità cellulare nel metodo di prova STE è valutata tramite misurazione quantitativa dei cristalli di formazan blu estratti dalle cellule, che sono prodotti dalle cellule vive per conversione enzimatica del colorante vitale MTT [3-(bromuro di 4,5-dimetiltiazol-2-ile)-2,5-difeniltetrazolio], noto anche come, bromuro di tiazolil blu tetrazolio (3). La vitalità cellulare osservata è confrontata con il controllo con solvente (vitalità relativa) e usata per stimare il pericolo potenziale che la sostanza chimica in esame presenta per l'occhio. La sostanza chimica in esame è classificata nella categoria 1 del GHS dell'ONU/CLP quando, sia al 5 % sia allo 0,05 % di concentrazione, la vitalità cellulare risulta inferiore o pari (≤) al 70 %. È invece considerata "senza categoria" nel GHS dell'ONU/CLP quando, sia al 5 % sia allo 0,05 % di concentrazione, la vitalità cellulare risulta superiore (>) al 70 %.

4. Nel presente metodo di prova, il termine "sostanza chimica in esame" fa riferimento alla sostanza oggetto della prova a prescindere dall'applicabilità del metodo STE alla sperimentazione sulle sostanze e/o miscele. Le definizioni sono riportate nell'appendice.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

5. Il presente metodo di prova si basa su un protocollo elaborato da Kao Corporation (4), che è stato oggetto di due diversi studi di validazione: l'uno a cura del comitato di validazione della società giapponese per le alternative alla sperimentazione animale (JSAAE, *Japanese Society for Alternative to Animal Experiments*) (5), l'altro a cura del Centro

([1]) Regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2008, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006 (GU L 353 del 31.12.2008, pag. 1).

giapponese per la validazione di metodi alternativi (JACVAM, *Japanese Center for the Validation of Alternative Methods*) (6). Una revisione inter pares è stata condotta da NICEATM/ICCVAM sulla base dei rapporti degli studi di validazione e dei *Background Review Documents* sul metodo di prova (7).

6. I dati ottenuti per le 125 sostanze chimiche (sostanze e miscele) testate con il metodo STE per individuare quelle che inducono gravi lesioni oculari (categoria 1 del GHS dell'ONU/CLP) (1) presentano un'accuratezza complessiva dell'83 % (104/125), una percentuale di falsi positivi dell'1 % (1/86) e una percentuale di falsi negativi del 51 % (20/39), rispetto alla prova *in vivo* sugli occhi del coniglio (7). La percentuale di falsi negativi ottenuta non è preoccupante in questo contesto perché tutte le sostanze chimiche in esame che producono una vitalità cellulare ≤ 70 % alla concentrazione del 5 % e > 70 % alla concentrazione dello 0,05 % saranno successivamente testate con altri metodi *in vitro* debitamente validati o, come ultima ratio, mediante la prova oculare *in vivo* sul coniglio, in funzione dei requisiti regolamentari e in conformità della strategia sperimentale sequenziale e degli approcci basati sul peso dell'evidenza attualmente raccomandati (1) (8). Le prove sono state eseguite prevalentemente su sostanze monocostituente, sebbene esista anche una quantità limitata di dati relativi alle prove sulle miscele. Il metodo di prova è in ogni caso tecnicamente applicabile alle prove sulle sostanze multicostituente e sulle miscele. Tuttavia, prima di testare una miscela con questo metodo di prova per ottenere dati a fini regolamentari, è opportuno chiedersi se, e in caso affermativo perché, i dati ottenuti possono essere ritenuti idonei per i fini regolamentari perseguiti. Tali considerazioni non sono necessarie laddove esista una disposizione normativa che obblighi a sottoporre a prova la miscela. Quando è stato usato per individuare le sostanze chimiche classificate nella categoria 1 del GHS dell'ONU/CLP, il metodo di prova STE non ha mostrato alcun altro limite particolare. I ricercatori potrebbero considerare di usare questo metodo per le sostanze chimiche, accettando una vitalità cellulare ≤ 70 % alle due concentrazioni del 5 % e dello 0,05 % come indice di risposta che induce gravi lesioni oculari, tali da giustificare la classificazione della sostanza nella categoria 1 del GHS dell'ONU/CLP senza ulteriore sperimentazione.

7. I dati ottenuti per le 130 sostanze chimiche (sostanze e miscele) sottoposte al metodo STE per individuare quelle che non richiedono classificazione per irritazione oculare o gravi lesioni oculari ("senza categoria" del GHS dell'ONU/CLP) presentano un'accuratezza complessiva dell'85 % (110/130), una percentuale di falsi negativi del 12 % (9/73) e una percentuale di falsi positivi del 19 % (11/57), rispetto ai dati ottenuti con la prova *in vivo* sugli occhi del coniglio (7). Se si escludono dai dati quelli relativi alle sostanze altamente volatili e a quelle solide diverse dai tensioattivi, l'accuratezza complessiva del metodo è pari al 90 % (92/102), la percentuale di falsi negativi al 2 % (1/54) e i falsi positivi al 19 % (9/48) (7). Pertanto i limiti potenziali del metodo di prova STE quando usato per individuare le sostanze chimiche che non richiedono classificazione per irritazione oculare o gravi lesioni oculari ("senza categoria" del GHS dell'ONU/CLP) consistono in un'alta percentuale di falsi negativi per i) le sostanze chimiche altamente volatili con una pressione di vapore superiore a 6 kPa e ii) le sostanze chimiche solide (sostanze e miscele) diverse dai tensioattivi e le miscele composte solo da tensioattivi. Queste sostanze chimiche sono escluse dall'ambito di applicabilità del metodo di prova STE (7).

8. Oltre alle sostanze chimiche di cui i paragrafi 6 e 7, i dati generati dal metodo di prova STE contengono anche dati interni relativi a 40 miscele che, rispetto alla prova oculare di Draize *in vivo*, presentano un'accuratezza dell'88 % (35/40), una percentuale di falsi positivi del 50 % (5/10) e assenza di falsi negativi (0/30) per fare previsioni sulle miscele che non richiedono classificazione secondo i sistemi GHS dell'ONU/CLP (9). Il metodo STE può pertanto essere applicato in un approccio "dal basso" per individuare le miscele "senza categoria" secondo il GHS dell'ONU/CLP, ad eccezione delle miscele solide diverse da quelle composte solo da tensioattivi, come estensione del suo limite di applicabilità alle sostanze solide. Inoltre le miscele contenenti sostanze con una pressione di vapore superiore a 6 kPa devono essere valutate attentamente per evitare previsioni ottimistiche, e vanno giustificate caso per caso.

9. Il metodo STE non può essere usato per identificare le sostanze chimiche appartenenti alla categoria 2 del GHS dell'ONU/CLP o alle categorie 2A (irritazione oculare) o 2B (irritazione oculare moderata) del GHS dell'ONU, a causa dell'ingente numero di sostanze chimiche di categoria 1 del GHS dell'ONU sottovalutate e considerate di categoria 2, 2A o 2B e di sostanze chimiche "senza categoria" nel GHS dell'ONU/CLP sopravvalutate e considerate di categoria 2, 2A o 2B (7). A tal fine possono essere necessarie ulteriori prove con un altro metodo adeguato.

10. Il metodo STE è adatto per le sostanze chimiche in esame disciolte o in sospensione uniforme per almeno 5 minuti in una soluzione salina fisiologica, in dimetilsulfossido (DMSO) al 5 % in soluzione salina, o in olio minerale. Il metodo STE non è adatto per le sostanze insolubili o che non possono essere in sospensione uniforme per almeno 5 minuti in una soluzione salina fisiologica, in dimetilsulfossido (DMSO) al 5 % in soluzione salina, o in olio minerale. È possibile usare olio minerale nel metodo STE perché l'esposizione è di breve durata. Questo metodo è quindi adatto per prevedere il pericolo potenziale che le sostanze chimiche insolubili in esame (ad esempio, alcoli grassi a catena lunga o chetoni) presentano per l'occhio, a condizione che siano miscibili in almeno uno dei tre solventi proposti sopra (4).

11. Il termine "sostanza chimica in esame" utilizzato nel presente metodo di prova designa l'oggetto della prova ([1]), a prescindere dall'applicabilità del metodo STE alla sperimentazione su sostanze e/o miscele.

PRINCIPIO DELLA PROVA

12. Il metodo STE è un saggio di citotossicità *in vitro* eseguito su un monostrato confluente di cellule di cornea di coniglio dello Statens Seruminstitut (SIRC, *Statens Seruminstitut Rabbit Cornea*), coltivate su micropiastre in policarbonato a 96 pozzetti (4). Dopo 5 minuti di esposizione alla sostanza in esame si determina quantitativamente la citotossicità misurando, mediante il test dell'MTT (4), la vitalità relativa delle cellule SIRC. Una diminuzione della vitalità cellulare è usata per predire gli effetti nocivi che causano lesioni oculari.

13. È stato segnalato che l'80 % di una soluzione instillata nell'occhio del coniglio è escreta attraverso il sacco congiuntivale nei tre o quattro minuti successivi all'applicazione, mentre più dell'80 % di una soluzione instillata nell'occhio umano è escreta nell'arco di uno o due minuti (10). Il metodo STE è inteso ad avvicinare questi tempi di esposizione e si avvale della citotossicità come endpoint per valutare le lesioni subite dalle cellule SIRC dopo cinque minuti di esposizione alla sostanza in esame.

DIMOSTRAZIONE DELLA COMPETENZA DI LABORATORIO

14. Prima di utilizzare il metodo STE qui descritto, i laboratori devono dimostrare le loro competenze tecniche classificando correttamente le undici sostanze raccomandate nella tabella 1. Tali sostanze sono state selezionate quali rappresentative dell'intera gamma di risposte corrispondenti a lesioni oculari gravi o irritazione oculare, sulla base dei risultati di prove *in vivo* sugli occhi del coniglio (linea guida n. 405) e del sistema di classificazione GHS dell'ONU (1). Altri criteri di selezione sono stati la disponibilità in commercio delle sostanze, la disponibilità di dati di riferimento *in vivo* di elevata qualità e la disponibilità di dati *in vitro* di elevata qualità ottenuti con il metodo STE (3). È possibile utilizzare un'altra sostanza per la quale esistano adeguati dati di riferimento *in vivo* e *in vitro* se una delle sostanze elencate non è disponibile o se il ricorso ad un'altra sostanza si giustifica, purché si applichino gli stessi criteri descritti nel presente metodo.

Tabella 1

Elenco delle sostanze chimiche per la verifica della competenza tecnica

Sostanza	N. CAS	Classe chimica ([1])	Stato fisico	Categoria GHS ONU/CLP *in vivo* ([2])	Solvente nella prova STE	Categoria GHS ONU/CLP STE
Cloruro di benzalconio (10 %, acquoso)	8001-54-5	Composto onio	Liquido	Categoria 1	Soluzione salina	Categoria 1

([1]) In occasione della riunione congiunta del giugno 2013 è stato concordato che, ove possibile, nei metodi di prova nuovi e aggiornati l'espressione "sostanza chimica in esame" sia utilizzata in modo più coerente per designare la sostanza oggetto della prova.

Sostanza	N. CAS	Classe chimica ([1])	Stato fisico	Categoria GHS ONU/CLP *in vivo* ([2])	Solvente nella prova STE	Categoria GHS ONU/CLP STE
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Etere	Liquido	Categoria 1	Soluzione salina	Categoria 1
Acid Red 92	18472-87-2	Composto eterociclico; composto del bromo; composto del cloro	Solido	Categoria 1	Soluzione salina	Categoria 1
Idrossido di sodio	1310-73-2	Alcali; sostanza chimica inorganica	Solido	Categoria 1 ([3])	Soluzione salina	Categoria 1
Butirolattone	96-48-0	Lattone, composto eterociclico	Liquido	Categoria 2A (Categoria 2 del CLP)	Soluzione salina	Non è possibile fare previsioni
1-ottanolo	111-87-5	Alcol	Liquido	Categoria 2A/B ([4]) (Categoria 2 del CLP)	Oli minerali	Non è possibile fare previsioni
Ciclopentanolo	96-41-3	alcol; idrocarburo, ciclico	Liquido	Categoria 2A/B ([5]) (Categoria 2 del CLP)	Soluzione salina	Non è possibile fare previsioni
2-Etossietil acetato	111-15-9	alcol; etere	Liquido	Senza categoria	Soluzione salina	Senza categoria
Dodecano	112-40-3	Idrocarburo, aciclico	Liquido	Senza categoria	Oli minerali	Senza categoria
Metilisobutilchetone	108-10-1	Chetone	Liquido	Senza categoria	Oli minerali	Senza categoria

Sostanza	N. CAS	Classe chimica ([1])	Stato fisico	Categoria GHS ONU/CLP *in vivo* ([2])	Solvente nella prova STE	Categoria GHS ONU/CLP STE
Solfato di 1,1-dimetilguanidina	598-65-2	Ammidina; composto di solfo	Solido	Senza categoria	Soluzione salina	Senza categoria

([1]) Le classi chimiche sono state determinate in base alle informazioni ricavate dalle pubblicazioni anteriori del NICEATM e, se queste non erano disponibili, in base al sistema MeSH®)(*Medicine's Medical Subject Headings*) della Biblioteca nazionale di medicina degli USA, via ChemIDplus®, accessibile all'indirizzo http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/, e con la determinazione delle strutture del NICEATM.

([2]) Sulla base dei risultati della prova *in vivo* sugli occhi del coniglio (linea guida dell'OCSE n. 405) e secondo il sistema GHS dell'ONU/CLP (1).

([3]) La classificazione nella categoria 1 si fonda sul potenziale corrosivo per la pelle di una soluzione di idrossido di sodio al 100 % (che figura tra le sostanze chimiche di prova a fini di competenza potenzialmente corrosive per la pelle elencate nella linea guida dell'OCSE n. 435) e sul criterio di classificazione per la categoria 1 del GHS dell'ONU/CLP (1).

([4]) La classificazione nelle categorie 2A o 2B dipende dall'interpretazione del criterio del GHS dell'ONU inteso a distinguere queste due categorie, ossia la constatazione degli effetti il settimo giorno in 2 animali su 6 oppure 4 animali su 6 per determinare la classificazione nella categoria 2A. I dati *in vivo* sono stati ricavati da due studi, ciascuno condotto su 3 animali. In uno studio gli effetti visibili il settimo giorno in 2 animali su 3 indicavano la classificazione nella categoria 2A (11), mentre nel secondo studio tutti gli endpoint misurati nei 3 animali erano spariti il settimo giorno, da cui la classificazione nella categoria 2B (12).

([5]) La classificazione nelle categorie 2A o 2B dipende dall'interpretazione del criterio del GHS dell'ONU inteso a distinguere queste due categorie, ossia la constatazione degli effetti il settimo giorno in 1 animali su 3 oppure 2 animali su 3 per determinare la classificazione nella categoria 2A. Lo studio *in vivo* è stato condotto su 3 animali. Tutti gli endpoint, tranne l'opacità della cornea e il rossore della congiuntiva in un animale, erano scomparsi il settimo giorno o prima. L'unico animale in cui gli effetti non erano completamente scomparsi il giorno 7 presentava un punteggio pari a 1 (al giorno 7) sia per l'opacità della cornea sia per il rossore della congiuntiva; gli effetti erano scomparsi al 14 ° giorno (11).

Abbreviazioni: N. CAS (*Chemical Abstracts Service Registry Number*) = Numero CAS (numero di registrazione nell'inventario europeo delle sostanze chimiche).

PROCEDURA

Preparazione del monostrato cellulare

15. Per l'esecuzione della prova con il metodo STE si utilizza la linea cellulare di cornea di coniglio SIRC. Si raccomanda che le cellule SIRC provengano da una banca di cellule riconosciuta, quale la *American Type Culture Collection* CCL60.

16. Le cellule SIRC sono coltivate a 37 °C in atmosfera umidificata al 5 % di CO_2, in una fiasca di coltura contenente un mezzo di coltura costituito di mezzo essenziale minimo di Eagle (MEM, *Minimum Essential Medium*) con aggiunta di siero fetale bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*) al 10 %, 2 mM di L-glutammina, 50–100 unità/ml di penicillina e 50-100 µg/ml di streptomicina. Le cellule che sono diventate confluenti nella fiasca di coltura devono essere separate per mezzo di una soluzione di tripsina-acido tetraetilendiaminoacetico, con o senza l'ausilio di un raschiatore. Le cellule sono moltiplicate in una fiasca da coltura (ad esempio, 2 o 3 passaggi) prima di essere utilizzate nelle prove di routine e non possono essere sottoposte a più di 25 passaggi dopo lo scongelamento.

17. Le cellule pronte ad essere utilizzate nella prova STE sono preparate alla densità adeguata e inoculate in piastre a 96 pozzetti. La densità di inoculazione raccomandata è di $6{,}0 \times 10^3$ cellule per pozzetto quando le cellule sono utilizzate quattro giorni dopo l'inoculazione, o $3{,}0 \times 10^3$ cellule per pozzetto quando sono utilizzate cinque giorni dopo l'inoculazione, per un volume di coltura di 200 µl. Le cellule utilizzate per la prova STE che sono inoculate in un mezzo di coltura alla densità adeguata raggiungeranno una confluenza superiore all'80 % al momento della prova, ossia quattro o cinque giorni dopo l'inoculazione.

Applicazione della sostanza chimica in esame e delle sostanze di controllo

18. Il solvente da privilegiare per disciogliere o sospendere la sostanza chimica in esame è la soluzione salina fisiologica. Se la sostanza chimica in esame si dimostra poco solubile, insolubile o non in grado di essere in sospensione uniforme per almeno cinque minuti nella soluzione salina, si opta per il DMSO al 5 % (n. CAS 67-68-5) in soluzione salina. Se la sostanza chimica in esame non può essere disciolta o messa in sospensione uniforme per almeno cinque minuti nella soluzione salina fisiologica né nel DMSO al 5 % in soluzione salina, il terzo solvente possibile è l'olio minerale (n. CAS 8042-47-5).

19. Le sostanze chimiche sono disciolte o sospese uniformemente a una concentrazione del 5 % (p/p) nel solvente prescelto e ulteriormente diluite con una serie di diluizioni di fattore 10 fino alle concentrazioni dello 0,5 % e dello 0,05 %. Ogni sostanza chimica deve essere testata alle due concentrazioni (5 % e 0,05 %). Le cellule coltivate sulla piastra a 96 pozzetti sono esposte a 200 µl/pozzetto di soluzione (o sospensione) della sostanza chimica in esame a 5 % o 0,05 % per cinque minuti a temperatura ambiente. Le sostanze chimiche in esame (sostanze monocostituente o sostanze o miscele multicostituente) sono considerate pure e diluite o sospese secondo il presente metodo, indipendentemente dal loro grado di purezza.

20. Il mezzo di coltura descritto al paragrafo 16 è utilizzato come controllo in ogni piastra di ogni ripetizione. Inoltre, le cellule devono anche essere esposte, per ogni piastra di ogni ripetizione, a campioni di controllo con solvente. È assodato che i solventi indicati al paragrafo 18 non hanno effetti nocivi sulla vitalità delle cellule SIRC.

21. Nel metodo di prova STE si deve utilizzare laurilsolfato di sodio (SLS) allo 0,01 % come controllo positivo in ogni piastra di ogni ripetizione. Per calcolare la vitalità cellulare del controllo positivo ogni piastra di ogni ripetizione deve includere anche un controllo del solvente con soluzione salina.

22. Un bianco è necessario per determinare la compensazione della densità ottica, da eseguirsi in pozzetti contenenti solo tampone fosfato in soluzione salina, senza calcio, magnesio (PBS-), né cellule.

23. Ogni campione (sostanza chimica in esame a 5 % e 0,05 %, controllo con mezzo, controllo con solvente e controllo positivo) deve essere sottoposto a prova con tre repliche per ogni ripetizione, esponendo le cellule a 200 µl della sostanza chimica adeguata, in esame o di controllo, per cinque minuti a temperatura ambiente.

24. Le sostanze chimiche di riferimento sono utili per valutare il potenziale di irritazione oculare di sostanze chimiche sconosciute appartenenti a una determinata classe di sostanze o prodotti chimici o per valutare il potenziale di irritazione relativo di una sostanza irritante per gli occhi nell'ambito di una serie specifica di risposte d'irritazione.

Misurazione della vitalità cellulare

25. Dopo l'esposizione lavare le cellule due volte con 200 µl di PBS e aggiungere 200 µl di soluzione MTT (0,5 mg MTT/ml di mezzo di coltura). Dopo due ore di reazione in un incubatore (37 °C, 5 % CO_2) decantare la soluzione MTT, estrarre l'MTT formazan aggiungendo 200 µl di 0,04 N di isopropanolo-acido cloridrico per 60 minuti al buio a temperatura ambiente e misurare l'assorbanza della soluzione MTT formazan a 570 nm con un lettore di piastre. Si verifica interferenza tra la sostanza chimica in esame e l'MTT (dovuta a coloranti o a riduttori diretti dell'MTT) solo se una quantità significativa della sostanza chimica in esame permane nel sistema sperimentale dopo il lavaggio che segue l'esposizione, come nel caso della cornea umana ricostruita in 3D o dei tessuti dell'epidermide umana ricostruiti, ma non nelle colture cellulari in 2D utilizzate nel metodo di prova STE.

Interpretazione dei risultati e modello predittivo

26. I valori della densità ottica (OD, *Optical Density*) ottenuti per ciascuna sostanza in esame sono poi utilizzati per calcolare la vitalità cellulare rispetto al controllo con solvente, il cui valore è fissato al 100 %. La vitalità cellulare relativa è espressa in percentuale ed è ottenuta dividendo la densità ottica della sostanza chimica in esame per la densità ottica del controllo con solvente dopo aver sottratto la densità ottica del bianco da ciascun valore.

$$Vitalità\ cellulare(\%) = \frac{(OD_{570}\ della\ sostanza\ in\ esame) - (OD_{570}\ del\ bianco)}{(OD_{570}\ del\ controllo\ con\ solvente) - (OD_{570}\ del\ bianco)} \times 100$$

Analogamente, la vitalità cellulare relativa di ogni controllo con solvente è espressa in percentuale ed è ottenuta dividendo la densità ottica di ogni controllo con solvente per la densità ottica del controllo con mezzo, dopo aver sottratto la densità ottica del bianco da ciascun valore.

27. Si devono eseguire tre ripetizioni indipendenti, contenenti ciascuna tre repliche (ossia n = 9). Si usa la media aritmetica dei tre pozzetti per ogni sostanza chimica in esame e ogni controllo con solvente in ogni ripetizione indipendente per calcolare la media aritmetica della vitalità cellulare relativa. La media aritmetica finale della vitalità cellulare è calcolata a partire dalle tre ripetizioni indipendenti.

28. Di seguito sono indicati i valori limite della vitalità cellulare per identificare le sostanze chimiche in esame in grado di indurre gravi lesioni oculari (categoria 1 del GHS dell'ONU/CLP) e le sostanze chimiche in esame che non richiedono classificazione per l'irritazione oculare o per gravi lesioni oculari ("senza categoria" del GHS dell'ONU/CLP).

Tabella 2

Modello predittivo del metodo di prova STE

Vitalità cellulare		Classificazione GHS dell'ONU/CLP	Applicabilità
Al 5 %	Allo 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Senza categoria	Sostanze e miscele, tranne: i) sostanze altamente volatili con una pressione di vapore superiore a 6 kPa [1] e ii) sostanze chimiche solide (sostanze e miscele) diverse dai tensioattivi e miscele composte solo da tensioattivi.
≤ 70 %	> 70 %	Non è possibile fare previsioni	Non pertinente
≤ 70 %	≤ 70 %	Categoria 1	Sostanze e miscele [2]

[1] Le miscele contenenti sostanze con una pressione di vapore superiore a 6 kPa devono essere valutate attentamente per evitare di fare previsioni ottimistiche e vanno giustificate caso per caso.

[2] In base ai risultati ottenuti soprattutto con sostanze monocostituente, sebbene esista una quantità limitata di dati anche sulle prove con miscele. Il metodo di prova è in ogni caso tecnicamente applicabile alle prove sulle sostanze multicostituente e sulle miscele. Prima di applicare il presente metodo di prova a una miscela per generare dati ai fini regolamentari perseguiti, si deve considerare se e, in caso affermativo, perché, possa fornire risultati adeguati a tale scopo. Tali considerazioni non sono necessarie se vige un obbligo normativo di sottoporre a prova la miscela.

Criteri di accettabilità

29. I risultati delle prove sono ritenuti accettabili se sono soddisfatti tutti i criteri seguenti:

a) la densità ottica del controllo con mezzo (esposto al mezzo di coltura) è pari o superiore a 0,3 dopo sottrazione della densità ottica del bianco;

b) la vitalità del controllo con solvente è pari o superiore all'80 % rispetto a quella del controllo con mezzo. Se ad ogni ripetizione si usano controlli con più di un solvente, ogni controllo deve dimostrare una vitalità cellulare superiore all'80 % per poter qualificare le sostanze chimiche saggiate con questi solventi.

c) La vitalità cellulare risultante dal controllo positivo (0,01 % SLS) si deve situare nell'intervallo tra due deviazioni standard della media storica. I limiti superiore e inferiore di accettabilità per il controllo positivo vanno aggiornati con frequenza, ossia a cadenza trimestrale oppure ogniqualvolta si esegua una prova accettabile nei laboratori in cui le prove sono eseguite sporadicamente (ossia, meno di una volta al mese). Se il laboratorio non porta a termine un numero sufficiente di esperimenti per stabilire una distribuzione dei controlli positivi statisticamente solida, è ammesso l'uso dei limiti superiore e inferiore di accettabilità stabiliti al momento della messa a punto del metodo, ossia tra il 21,1 % e il 62,3 % secondo i dati storici del laboratorio, e la distribuzione interna è determinata durante le prime prove di routine;

d) la deviazione standard della vitalità cellulare finale risultante da tre ripetizioni indipendenti deve essere inferiore al 15 % per entrambe le concentrazioni, al 5 % e allo 0,05 %, della sostanza chimica in esame.

Se uno o più criteri non sono soddisfatti i risultati devono essere scartati e devono essere condotte altre tre ripetizioni indipendenti.

DATI E RELAZIONE

Dati

30. I dati da riferire sono quelli ottenuti per ogni pozzetto (ad esempio, i valori della vitalità cellulare) di ogni ripetizione, così come la media globale, la deviazione standard e la classificazione.

Relazione sull'esecuzione della prova

31. I seguenti dati devono figurare nella relazione sull'esecuzione della prova.

Sostanze chimiche in esame e di controllo

— Sostanza monocostituente: identificazione della sostanza chimica, mediante denominazioni quali IUPAC o CAS, il numero CAS, il codice SMILES o InChI, la formula di struttura e/o altri identificatori;

— Sostanza multicostituente, UVCB e miscela: caratterizzazione, nella misura del possibile, ad esempio attraverso l'identità chimica (cfr. sopra), la purezza, le proporzioni quantitative e le proprietà fisico-chimiche pertinenti (cfr. sopra) dei costituenti, secondo i dati disponibili.

— Stato fisico, volatilità, pH, LogP, peso molecolare, classe chimica e altre proprietà fisico-chimiche pertinenti per la realizzazione dello studio, secondo i dati disponibili.

— Purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico ecc.

— Trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione).

— condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili.

Condizioni e procedure del metodo di prova

— Nome e indirizzo dello sponsor, dell'infrastruttura utilizzata per la prova e del responsabile dello studio.

— Descrizione del metodo di prova.

— Linea cellulare utilizzata e sua provenienza, numero di passaggi e livello di confluenza delle cellule utilizzate per la prova.

— Dettagli della procedura di prova.

— Numero di ripetizioni e di repliche.

— Concentrazioni della sostanza chimica in esame (se diverse da quelle raccomandate).

— Giustificazione della scelta del solvente per ciascuna sostanza chimica in esame.

— Durata dell'esposizione alla sostanza chimica in esame (se diversa da quella raccomandata).

— Descrizione delle eventuali modifiche del protocollo sperimentale.

— Descrizione dei criteri di valutazione e di decisione.

— Riferimenti alla media e alla deviazione standard storiche dei controlli positivi.

— Dimostrazione della competenza del laboratorio nell'applicazione del metodo di prova (ad esempio, nel saggio delle sostanze di riferimento) o dimostrazione della riproducibilità delle prestazioni del metodo di prova nel tempo.

Risultati

— Per ciascuna sostanza chimica in esame e di controllo, e per ciascuna concentrazione testata, presentare in una tabella i valori della densità ottica per ogni pozzetto, la media aritmetica dei valori della densità ottica per ogni ripetizione indipendente, la percentuale della vitalità cellulare per ogni ripetizione indipendente e la media aritmetica finale della percentuale della vitalità cellulare e della deviazione standard per le tre ripetizioni.

— Risultati del controllo con mezzo, del controllo con solvente e del controllo positivo comprovanti che lo studio soddisfa i criteri di accettabilità.

— Descrizione di altri effetti osservati.

— Classificazione generale stabilita con riferimento al modello predittivo/ai criteri di decisione applicati.

Discussione dei risultati

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

(1) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponibile all'indirizzo: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

(3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(4) Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22,760-770.

(5) Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25,796-809.

(6) Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, pp.1 855-1 869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Disponibile all'indirizzo: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Capitolo B.5 del presente allegato, Irritazione/corrosione oculare acuta.

(9) Saito K, *et al.* (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.

(10) Mikkelson TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm.* Sci.1 648-1 653.

(11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Brussels, Belgium.

(12) Gautheron P, *et al.* (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. Fundam Appl *Toxicol.* 18, 442–449.

(13) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Appendice

DEFINIZIONI

Accuratezza: grado di concordanza tra i risultati ottenuti con il metodo di prova e i valori di riferimento accettati. Misura l'efficienza del metodo di prova e costituisce un aspetto della pertinenza. Il termine è spesso utilizzato come sinonimo di "concordanza" per indicare la percentuale di risultati corretti di un metodo di prova (13).

Sostanza di riferimento: la sostanza usata come standard di confronto rispetto alla sostanza chimica in esame. La sostanza di riferimento ha le seguenti proprietà: i) origine o origini coerenti e affidabili; ii) analogia strutturale e funzionale alla classe delle sostanze in esame; iii) caratteristiche fisiche/chimiche note; iv) dati di supporto relativi agli effetti noti; v) efficacia nota nell'ambito della risposta auspicata.

Approccio "dal basso": l'approccio graduale applicato nel caso di una sostanza chimica che si ritiene non debba essere classificata in termini di irritazione oculare o gravi lesioni oculari, che inizia con la determinazione delle sostanze chimiche che non richiedono classificazione (esito negativo) rispetto ad altre sostanze chimiche (esito positivo).

Sostanza chimica: sostanza o miscela.

Irritazione oculare: la produzione di alterazioni nell'occhio in seguito all'applicazione della sostanza chimica in esame sulla superficie anteriore dell'occhio, totalmente reversibili entro 21 giorni dall'applicazione. Sinonimo di "effetti reversibili sugli occhi" e "categoria 2 del GHS dell'ONU".

Percentuale di falsi negativi: la percentuale di tutte le sostanze chimiche positive falsamente identificate come negative da un metodo di prova. È un indicatore dell'efficienza del metodo di prova.

Percentuale di falsi positivi: la percentuale di tutte le sostanze chimiche negative falsamente identificate come positive da un metodo di prova. È un indicatore dell'efficienza del metodo di prova.

Pericolo: la proprietà intrinseca di un agente o di una situazione che ha il potenziale di causare effetti nocivi se un organismo, un sistema o una (sotto)popolazione vi sono esposti.

Controllo con mezzo: la replica non trattata che contiene tutti i componenti di un sistema di prova. Il campione subisce il medesimo procedimento dei campioni trattati con la sostanza chimica in esame e degli altri campioni di controllo per determinare se il solvente interagisce con il sistema di prova.

Miscela: la miscela o soluzione composta di due o più sostanze.

Sostanza monocostituente: la sostanza, definita in base alla sua composizione quantitativa, in cui un costituente principale è presente in percentuale pari ad almeno l'80 % (p/p).

MTT: bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ile)-2,5-difeniltetrazolio; tiazolil blu tetrazolio bromuro.

Sostanza multicostituente: la sostanza, definita in base alla sua composizione quantitativa, in cui più di un costituente principale è presente in concentrazione ≥ 10 % (p/p) e < 80 % (p/p). La sostanza multicostituente è il risultato di un processo di fabbricazione. La differenza tra miscela e sostanza multicostituente risiede nel fatto che la miscela è ricavata mischiando due o più sostanze senza che avvenga una reazione chimica, mentre la sostanza multicostituente è il risultato di una reazione chimica.

OD: densità ottica.

Controllo positivo: la replica contenente tutti i componenti di un sistema di prova, trattata con una sostanza che notoriamente induce una risposta positiva. Per poter valutare la variabilità nel tempo della risposta dei controlli positivi, l'entità della risposta positiva non deve essere eccessiva.

Pertinenza: descrizione del rapporto tra la prova e l'effetto studiato; indica se la prova è significativa e utile per uno scopo specifico. È il grado con cui la prova misura o prevede correttamente l'effetto biologico di interesse. La pertinenza comprende una valutazione dell'accuratezza (concordanza) di una prova (10).

Affidabilità: la misura in cui il metodo di prova può essere riprodotto nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi utilizzando il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità interna al laboratorio e la ripetibilità fra i laboratori (13).

Sensibilità: la percentuale di tutte le sostanze chimiche positive/attive correttamente classificate dalla prova. Misura l'accuratezza del metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza del metodo di prova (10).

Gravi lesioni oculari: la produzione di danni ai tessuti oculari o indebolimento grave della vista in seguito all'applicazione della sostanza chimica in esame sulla parte anteriore dell'occhio, non completamente reversibile entro 21 giorni dall'applicazione. Sinonimo di "effetti irreversibili sugli occhi" e "categoria 1 del GHS dell'ONU".

Controllo con solvente/mezzo disperdente: il campione non trattato che contiene tutti i componenti del sistema di prova, compreso il solvente o il mezzo disperdente, e subisce il medesimo procedimento dei campioni trattati con la sostanza chimica in esame e degli altri campioni di controllo per stabilire la risposta di base nei campioni trattati con la sostanza chimica in esame disciolta nello stesso solvente o mezzo disperdente. Nelle prove con controlli paralleli con mezzo, questo campione dimostra anche se il solvente o il mezzo disperdente può interagire con il sistema sperimentale.

Specificità: la percentuale di tutte le sostanze chimiche negative/inattive correttamente classificate dalla prova. Misura l'accuratezza del metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza del metodo (13).

Sostanza: l'elemento chimico e i suoi composti allo stato naturale o ottenuti mediante un processo di produzione, compresi gli additivi necessari a mantenerne la stabilità e le impurità derivanti dal processo utilizzato, ma esclusi i solventi che possono essere separati senza compromettere la stabilità della sostanza o modificarne la composizione.

Tensioattivo (o surfattante): la sostanza chimica, come un detergente, in grado di ridurre la tensione superficiale di un liquido consentendo quindi di formare schiuma o penetrare solidi; è noto anche come agente umettante.

Sostanza chimica in esame: la sostanza o miscela testata applicando il presente metodo di prova.

Strategia di prova in sequenza: la strategia graduale di prova in cui sono vagliate, secondo un ordine specificato, tutte le informazioni disponibili sulla sostanza chimica in esame, seguendo in ciascuna fase un approccio basato sul peso dell'evidenza, al fine di stabilire se vi sono informazioni sufficienti per prendere una decisione di classificazione del pericolo prima di procedere alla fase successiva. Se è possibile assegnare il potenziale di irritazione della sostanza chimica in esame in base alle informazioni disponibili, non è necessario svolgere altre prove. Se non è possibile assegnare il potenziale di irritazione della sostanza chimica in esame in base alle informazioni disponibili, si esegue una procedura sperimentale graduale in sequenza sugli animali fino a stabilire una classificazione inequivocabile.

Approccio "dall'alto": l'approccio graduale applicato nel caso di una sostanza chimica in esame sospettata di causare gravi lesioni oculari, che inizia con la determinazione delle sostanze chimiche che inducono gravi lesioni oculari (esito positivo) rispetto ad altre sostanze chimiche (esito negativo).

Sistema mondiale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (GHS dell'ONU): sistema di classificazione delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) secondo tipi e livelli standardizzati di rischio fisico, sanitario e ambientale, che elabora i relativi elementi di comunicazione, quali pittogrammi, avvertenze, indicazioni di pericolo, consigli di prudenza e schede informative di sicurezza, per trasmettere informazioni sugli effetti avversi di dette sostanze a tutela delle persone (compresi datori di lavoro, lavoratori, trasportatori, consumatori e personale di pronto intervento) e dell'ambiente (1).

Categoria 1 del GHS dell'ONU: cfr. "Gravi lesioni oculari".

Categoria 2 del GHS dell'ONU: cfr. "Irritazione oculare".

Senza categoria del GHS dell'ONU/CLP: la sostanza chimica che non rientra nella categoria 1 o 2 del GHS dell'ONU/CLP (o categoria 2A o 2B del GHS dell'ONU).

UVCB (*Substance of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products or Biological Materials*): sostanze di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali biologici.

B.69 METODO DI PROVA SU MODELLO DI EPITELIO CORNEALE UMANO RICOSTITUITO (RhCE) PER L'IDENTIFICAZIONE DELLE SOSTANZE CHIMICHE CHE NON RICHIEDONO CLASSIFICAZIONE NÉ ETICHETTATURA PER IRRITAZIONE OCULARE O GRAVI LESIONI OCULARI

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 492 (2017). Per «*grave lesione oculare*» s'intende la lesione dei tessuti oculari o la degradazione grave della vista causate dall'applicazione della sostanza chimica in esame sulla superficie anteriore dell'occhio, non completamente reversibile entro 21 giorni dall'applicazione, secondo la definizione del Sistema mondiale armonizzato di classificazione e di etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (GHS, *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*) (1) e del regolamento (CE) n. 1272/2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele (CLP, *Classification, Labelling, Packaging*) ([1]). Sempre secondo il GHS dell'ONU e il CLP, per «*irritazione oculare*» s'intende la produzione di alterazioni nell'occhio a seguito dell'applicazione della sostanza chimica in esame sulla superficie anteriore dell'occhio, totalmente reversibili entro 21 giorni dall'applicazione. Le sostanze chimiche in esame che inducono gravi lesioni oculari sono classificate nella categoria 1 del GHS dell'ONU e del CLP, mentre quelle che inducono irritazione oculare sono classificate nella categoria 2 del GHS dell'ONU e del CLP. Le sostanze chimiche in esame non classificate in termini di irritazione oculare o gravi lesioni oculari sono definite come non rispondenti ai criteri di classificazione delle categorie 1 o 2 (2A o 2B) del GHS dell'ONU e del CLP, vale a dire sono considerate «senza categoria» nei suddetti sistemi.

2. Tradizionalmente, la valutazione delle lesioni oculari gravi o dell'irritazione oculare implicava l'uso di animali da esperimento (metodo di prova B.5) (2). La scelta del metodo di prova più adatto e l'uso del presente metodo devono essere valutati nel contesto del documento di orientamento dell'OCSE *Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation* (39).

3. Il presente metodo descrive una procedura *in vitro* che permette di identificare le sostanze chimiche (sostanze e miscele) che non richiedono classificazione né etichettatura per l'irritazione oculare o per gravi lesioni oculari in conformità dei sistemi GHS dell'ONU e CLP. Utilizza un modello di epitelio corneale umano ricostituito (*Reconstructed human Cornea-Like Epithelium*, RhCE) che riproduce fedelmente le proprietà istologiche, morfologiche biochimiche e fisiologiche dell'epitelio corneale umano. Altri quattro metodi di prova *in vitro* sono stati validati, considerati scientificamente validi e adottati come metodi prova B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) e B.68 (6) per studiare l'endpoint per la salute umana delle gravi lesioni oculari/dell'irritazione oculare.

4. Il presente metodo contempla due prove validate che usano modelli di RhCE disponibili in commercio. La prova d'irritazione oculare *EpiOcular™ Eye Irritation Test* («EpiOcular™ EIT») e la prova d'irritazione oculare su epitelio corneale umano *SkinEthic™ Human Corneal Epithelium Human Corneal Epithelium Eye Irritation Test* («SkinEthic™ HCE EIT») sono state usate in studi di validazione (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13) per valutare l'irritazione oculare/le gravi lesioni oculari. Queste due prove utilizzano come sistema sperimentale modelli tessutali di RhCE disponibili in commercio, di seguito denominati «metodi di riferimento validati» (*Validated Reference Method*, VRM), nella fattispecie VRM1 e VRM2. In base a questi studi di validazione e alla revisione *inter pares* indipendente (9)(12), è stato concluso che le prove d'irritazione oculare EpiOcular™ EIT e SkinEthic™ HCE EIT possono identificare correttamente le sostanze chimiche (sostanze e miscele) che non richiedono classificazione né etichettatura per l'irritazione oculare o per gravi lesioni oculari in conformità del sistema GHS dell'ONU, e sono state raccomandate per tale finalità in quando riconosciute scientificamente valide (13).

5. È generalmente riconosciuto che nel prossimo futuro non sarà disponibile alcun metodo di prova *in vitro* che da solo possa sostituire completamente la prova oculare di Draize *in vivo* (2) (14) per prevedere tutte le risposte rientranti nella gamma delle lesioni oculari gravi/irritazione oculare indotte dalle diverse classi chimiche. Non è tuttavia da escludere che la prova oculare di Draize possa essere completamente sostituita da combinazioni strategiche di metodi alternativi nell'ambito di strategie di prova (sequenziali), come l'approccio «dal basso»/«dall'alto» (15). L'approccio «dal basso» (15) è indicato per i casi in cui, in base alle informazioni esistenti, la sostanza chimica non dovrebbe causare un'irritazione oculare tale da richiedere la classificazione, mentre l'approccio «dall'alto» (15) è appropriato nei casi in cui, in base alle informazioni esistenti, si prevede che la sostanza chimica induca gravi lesioni oculari. Le prove d'irritazione oculare EpiOcular™ EIT e SkinEthic™ HCE EIT sono raccomandate per identificare, senza ulteriore sperimentazione, le sostanze chimiche che non richiedono classificazione per irritazione oculare o gravi lesioni

([1]) Regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2008, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006 (GU L 353 del 31.12.2008, pag. 1).

oculari secondo il sistema GHS dell'ONU/CLP («senza categoria»), nell'ambito di una strategia di sperimentazione quale l'approccio «dal basso»/«dall'alto» suggerito da Scott *et al.*, ad esempio come prima fase di un approccio «dal basso» o come una delle ultime fasi di un approccio «dall'alto» (15). Tuttavia, le prove d'irritazione oculare EpiOcular™ EIT e SkinEthic™ HCE EIT non sono concepite per stabilire se una sostanza chimica rientra nella categoria 1 (gravi lesioni oculari) o nella categoria 2 (irritazione oculare) del GHS dell'ONU/CLP. Tale distinzione dovrà essere effettuata in un'altra fase di una strategia di prove in sequenza (15). La sostanza chimica in esame che con le prove d'irritazione oculare EpiOcular™ EIT e SkinEthic™ HCE EIT risulti causare irritazione oculare/gravi lesioni oculari dovrà essere sottoposta a ulteriori prove (*in vitro* e/o *in vivo*) per stabilirne la classificazione definitiva (nella categoria 1, 2 o «senza categoria» del GHS dell'ONU/CLP, utilizzando, ad esempio, i metodi di prova B.47, B.48, B.61 o B.68.

6. Scopo del presente metodo di prova è descrivere la procedura impiegata per valutare il pericolo potenziale che la sostanza chimica in esame presenta per l'occhio, sulla base della capacità della sostanza di indurre citotossicità in un modello tessutale di RhCE, misurata con il test dell'MTT (16) (cfr. il paragrafo 21). La vitalità del tessuto RhCE dopo l'esposizione alla sostanza in esame è determinata confrontandola con quella dei tessuti trattati con la sostanza scelta per il controllo negativo (% di vitalità), e successivamente utilizzata per prevedere il pericolo potenziale che la sostanza chimica in esame presenta per l'occhio.

7. Sono disponibili standard di prestazione (17) per semplificare la validazione delle prove *in vitro*, nuove o modificate, che usano RhCE e che sono simili alle prove d'irritazione oculare EpiOcular™ EIT e SkinEthic™ HCE EIT, in conformità dei principi stabiliti nel documento di orientamento dell'OCSE n. 34 (18), e per modificare rapidamente la linea guida dell'OCSE n. 492 per potervele includere. L'accettazione reciproca dei dati conformemente all'accordo OCSE sarà garantita solo per le prove validate in base agli standard di prestazione, se tali prove sono state esaminate e integrate nella corrispondente linea guida dell'OCSE.

DEFINIZIONI

8. Le definizioni figurano nell'appendice 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

9. Il presente metodo si basa su modelli di tessuto tridimensionali di RhCE disponibili in commercio e prodotti a partire da cheratinociti primari dell'epidermide umana (EpiOcular™ OCL-200) o da cellule epiteliali corneali umane immortalizzate (SkinEthic™ HCE/S). I costrutti tessutali di RhCE EpiOcular™ OCL-200 e SkinEthic™ HCE/S sono simili alla struttura tridimensionale dell'epitelio corneale *in vivo* e sono prodotti a partire da cellule della specie d'interesse (19)(20). Inoltre le prove misurano direttamente la citotossicità dovuta alla penetrazione transcorneale della sostanza chimica e alla produzione di lesioni cellulari e tessutali; in base alla risposta citotossica si determina quindi la risposta globale di grave lesione oculare/irritazione oculare *in vivo*. Le lesioni cellulari possono essere indotte da varie modalità d'azione (cfr. il paragrafo 20), ma la citotossicità svolge un ruolo meccanicistico importante, se non primario, nel determinare la reazione complessiva risultante in grave lesione oculare/irritazione oculare dopo esposizione a una sostanza chimica, che si manifesta *in vivo* principalmente mediante opacità della cornea, infiammazione dell'iride (irite), rossore e/o chemosi della congiuntiva, indipendentemente dai processi fisico chimici delle lesioni tessutali.

10. Ai fini dello studio di validazione su cui si fonda il presente metodo di prova è stata testata una vasta gamma di sostanze chimiche, che rappresentano svariati tipi e classi chimiche, pesi molecolari, LogP, strutture chimiche ecc. La banca dati di validazione della prova d'irritazione oculare EpiOcular™ EIT conteneva complessivamente 113 sostanze chimiche che, secondo un'analisi dell'OCSE svolta con l'ausilio del sofware QSAR, rappresentavano 95 gruppi organici funzionali diversi (8). La maggior parte di queste sostanze erano monocostituente, ma lo studio includeva anche molte sostanze multicostituente (tra cui 3 omopolimeri, 5 copolimeri e 10 quasi polimeri). Per quanto riguarda lo stato fisico e le categorie del GHS dell'ONU/CLP, le 113 sostanze chimiche testate erano così distribuite: 13 liquidi di categoria 1, 15 solidi di categoria 1, 6 liquidi di categoria 2A, 10 solidi di categoria 2A, 7 liquidi di categoria 2B, 7 solidi di categoria 2B, 27 liquidi senza categoria e 28 solidi senza categoria (8). La banca dati di validazione della prova d'irritazione oculare SkinEthic™ HCE EIT conteneva complessivamente 200 sostanze chimiche, che rappresentavano 165 gruppi organici funzionali diversi (8)(10)(11). La maggior parte di queste sostanze chimiche erano monocostituente, ma lo studio includeva anche molte sostanze multicostituente (tra cui 10 omopolimeri). Per quanto riguarda lo stato fisico e le categorie del GHS dell'ONU/CLP, le 200 sostanze chimiche testate erano così distribuite: 27 liquidi di categoria 1, 24 solidi di categoria 1, 19 liquidi di categoria 2A, 10 solidi di categoria 2A, 9 liquidi di categoria 2B, 8 solidi di categoria 2B, 50 liquidi senza categoria e 53 solidi senza categoria (10) (11).

11. Il presente metodo di prova è applicabile a sostanze e miscele solide, liquide, semisolide e sotto forma di cere. I liquidi possono essere acquosi o non acquosi, i solidi possono essere solubili o insolubili in acqua. Quando possibile, prima dell'applicazione i solidi devono essere frantumati in polvere fine; non sono necessarie altre forme di pretrattamento del campione. I gas e gli aerosol non sono stati valutati in alcuno studio di validazione. Benché sia ipotizzabile che possano essere testati utilizzando la tecnologia RhCE, l'attuale metodo di prova non permette la sperimentazione su gas e aerosol.

12. Le sostanze chimiche in esame che assorbono la luce alla stessa lunghezza d'onda dell'MTT formazan (naturalmente o dopo il trattamento) e quelle che possono ridurre direttamente il colorante vitale MTT (in MTT formazan) potrebbero interferire con le misurazioni della vitalità tessutale, perciò occorre utilizzare controlli adattati per correggere la prova in funzione di queste interferenze. Il tipo di controlli adattati necessari dipenderà dal tipo d'interferenza prodotta dalla sostanza chimica in esame e dalla procedura utilizzata per quantificare l'MTT formazan (cfr. i paragrafi 36-42).

13. I risultati ottenuti dagli studi di pre-validazione (21) (22) e di validazione (8) (10) (11) hanno dimostrato che entrambe le prove d'irritazione oculare, EpiOcular™ EIT e SkinEthic™ HCE EIT, possono essere condotte da laboratori senza alcuna specifica esperienza su dette prove, e che sono riproducibili a livello intralaboratorio e interlaboratori. Da questi studi risulta che, in base ai dati relativi a 113 sostanze chimiche, il livello atteso di riproducibilità della prova d'irritazione oculare EpiOcular™ EIT per quanto riguarda la concordanza delle previsioni è dell'ordine del 95 % a livello intralaboratorio e del 93 % a livello interlaboratori. Il livello atteso di riproducibilità della prova d'irritazione oculare SkinEthic™ HCE EIT per quanto riguarda la concordanza delle previsioni, in base ai dati relativi a 120 sostanze chimiche è dell'ordine del 92 % a livello intralaboratorio e del 95 % a livello interlaboratori.

14. La prova d'irritazione oculare EpiOcular™ EIT può essere usata per identificare le sostanze chimiche che non richiedono una classificazione per irritazione oculare o per gravi lesioni oculari secondo il sistema di classificazione GHS dell'ONU/CLP. Considerando i dati ottenuti nello studio di validazione (8), la prova d'irritazione oculare EpiOcular™ EIT ha un'accuratezza globale dell'80 % (su 112 sostanze chimiche), una sensibilità del 96 % (su 57 sostanze chimiche), un tasso di falsi negativi del 4 % (su 57 sostanze chimiche), una specificità del 63 % (su 55 sostanze chimiche) e un tasso di falsi positivi del 37 % (su 55 sostanze chimiche), rispetto ai dati di riferimento ottenuti con la prova *in vivo* sugli occhi del coniglio (metodo di prova B.5) (2)(14) classificati secondo il GHS dell'ONU/CLP. In uno studio in cui sono state testate 97 formulazioni di sostanze agrochimiche liquide, la prova d'irritazione oculare EpiOcular™ EIT ha dimostrato prestazioni simili a quelle dello studio di validazione per questo tipo di miscele (23). Le 97 formulazioni erano così distribuite: 21 nella categoria 1, 19 nella categoria 2A, 14 nella categoria 2B e 43 senza categoria, secondo il GHS dell'ONU e sulla base dei dati di riferimento ottenuti con la prova *in vivo* sugli occhi del coniglio (metodo di prova B.5) (2)(14). Si è ottenuto un'accuratezza globale dell'82 % (su 97 formulazioni), una sensibilità del 91 % (su 54 formulazioni), un tasso di falsi positivi del 9 % (su 54 formulazioni), una specificità del 72 % (su 43 formulazioni) e un tasso di falsi positivi del 28 % (su 43 formulazioni) (23).

15. La prova d'irritazione oculare SkinEthic™ HCE EIT può essere usata per identificare le sostanze chimiche che non richiedono una classificazione per irritazione oculare o per gravi lesioni oculari secondo il sistema di classificazione GHS dell'ONU/CLP. Considerando i dati ottenuti nello studio di validazione (10)(11), la prova d'irritazione oculare SkinEthic™ HCE EIT ha un'accuratezza globale dell'84 % (su 200 sostanze chimiche), una sensibilità del 95 % (su 97 sostanze chimiche), un tasso di falsi negativi del 5 % (su 97 sostanze chimiche), una specificità del 72 % (su 103 sostanze chimiche) e un tasso di falsi positivi del 28 % (su 103 sostanze chimiche), rispetto ai dati di riferimento ottenuti con la prova *in vivo* sugli occhi del coniglio (metodo di prova B.5) (2)(14) classificati secondo il GHS dell'ONU/CLP.

16. Le percentuali di falsi negativi ottenuti con entrambe le prove RhCE, su sostanze o miscele, rientrano nel 12 % di probabilità generale che le sostanze chimiche siano classificate nella categoria 2 oppure «senza categoria» in base al sistema GHS dell'ONU e della classificazione CLP a seguito di una prova oculare *in vivo* di Draize, in prove ripetute a causa della variabilità intrinseca al metodo durante l'esecuzione della prova (24). Le percentuali di falsi negativi ottenuti con entrambe le prove RhCE, su sostanze o miscele, non sono preoccupanti in questo contesto perché tutte le sostanze chimiche in esame che producono una vitalità tessutale pari o inferiore alle soglie definite (cfr. il paragrafo 44) richiederanno ulteriore sperimentazione con altri metodi di prova *in vitro*, o, come ultima ratio, sul coniglio, in

funzione dei requisiti regolamentari e in conformità della strategia sperimentale sequenziale in un approccio basato sul peso dell'evidenza. Questi metodi di prova possono essere usati per tutti i tipi di sostanze chimiche in cui è accettabile un risultato negativo al fine di non classificare una sostanza chimica per irritazione oculare o gravi lesioni oculari («senza categoria» secondo il sistema GHS dell'ONU/CLP). Occorre consultare le autorità di regolamentazione competenti prima di utilizzare i metodi EpiOcular™ EIT e SkinEthic™ HCE EIT nell'ambito di sistemi di classificazione diversi dal sistema GHS dell'ONU/CLP.

17. Un limite di questo metodo di prova è che non permette di distinguere le sostanze chimiche che producono irritazione cutanea o effetti reversibili sugli occhi (categoria 2) da quelle che determinano gravi lesioni oculari o effetti irreversibili sugli occhi (categoria 1 del sistema GHS dell'ONU/CLP), né le sostanze che producono irritazione oculare (categoria facoltativa 2A) da quelle moderatamente irritanti per gli occhi (categoria facoltativa 2B), come definite nella classificazione GHS dell'ONU (1). Per operare tale distinzione, occorre procedere a ulteriore sperimentazione con metodi di prova *in vitro*.

18. Il termine «sostanza chimica in esame» utilizzato nel presente metodo di prova designa l'oggetto della prova ([2]), a prescindere dall'applicabilità del metodo RhCE alle prove di sostanze e/o miscele.

PRINCIPIO DELLA PROVA

19. La sostanza in esame viene applicata localmente ad almeno due modelli tridimensionali di RhCE e viene misurata la vitalità del tessuto dopo il periodo di esposizione e di incubazione post-trattamento. Il tessuto RhCE è un tessuto ricostituito da cheratinociti epiteliali primari di origine umana o da cellule epiteliali corneali immortalizzate di origine umana, che sono stati coltivati per più giorni fino a formare un epitelio stratificato, squamoso, altamente differenziato e morfologicamente simile all'epitelio corneale umano. Il costrutto tessutale RhCE EpiOcular™ EIT consiste di almeno tre strati di cellule vitali e di una superficie non cheratinizzata, con una struttura simile a quella della cornea *in vivo*. Il costrutto tessutale RhCE SkinEthic™ HCE consiste di almeno 4 strati di cellule vitali, incluse cellule basali colonnari, cellule amplificatrici transitorie e cellule squamose superficiali simili a quelle che si trovano nel normale epitelio corneale umano (20) (26).

20. Gravi danni oculari/irritazioni oculari indotti da una sostanza chimica che si manifestano *in vivo*, principalmente mediante opacità corneale, infiammazione dell'iride (irite) e rossore e/o chemosi congiuntivale, sono il risultato di una cascata di eventi che iniziano con la penetrazione della sostanza chimica nella cornea e/o nella congiuntiva e producono lesioni cellulari. Le lesioni cellulari possono essere generate mediante varie modalità d'azione, tra cui: la lisi della membrana cellulare (solventi organici o di agenti tensioattivi); la coagulazione di macromolecole (proteine, in particolare mediante solventi organici, tensioattivi, acidi e alcali); saponificazione dei lipidi (alcali, ad esempio); e alchilazione o altre interazioni covalenti con macromolecole (ad es. mediante prodotti sbiancanti, alchilanti e perossidi) (15) (27) (28). Tuttavia, è stato dimostrato che la citotossicità svolge un ruolo meccanicistico importante, se non primario, nel determinare la reazione complessiva risultante in grave lesione oculare/irritazione oculare dopo esposizione a una sostanza chimica, indipendentemente dai processi fisico-chimici che sottendono alle lesioni tessutali (29)(30). Inoltre, il potenziale di una sostanza chimica di causare gravi lesioni oculari/irritazione oculare è determinato principalmente mediante l'entità del danno iniziale (31), che è correlato al grado di morte cellulare (29) e all'entità delle successive reazioni e delle eventuali conseguenze (32). Pertanto, le sostanze con un leggero effetto irritante interessano in genere solo l'epitelio corneale superficiale, le sostanze moderatamente irritanti ledono principalmente l'epitelio e lo stroma superficiale, mentre le sostanze che causano gravi irritazioni danneggiano l'epitelio, lo stroma profondo e talvolta l'endotelio della cornea (30) (33). La misurazione della vitalità di un costrutto tessutale RhCE dopo esposizione topica a una sostanza chimica allo scopo di individuare le sostanze che non richiedono classificazione per irritazione oculare o gravi lesioni oculari («senza categoria» del GHS dell'ONU/CLP) si basano sull'assunto che tutte le sostanze che producono gravi lesioni oculari o irritazione oculare inducono citotossicità nell'epitelio corneale e/o nella congiuntiva.

([2]) In occasione della riunione congiunta del giugno 2013 è stato concordato che, ove possibile, nei metodi di prova nuovi e aggiornati l'espressione «sostanza chimica in esame» sia utilizzata in modo più coerente per designare la sostanza oggetto della prova.

21. La vitalità del tessuto RhCE è tradizionalmente misurata tramite conversione enzimatica del colorante vitale MTT [bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ile)-2,5-difeniltetrazolio; bromuro di tiazolil blu tetrazolio; numero CAS 298-93-1] da parte delle cellule vitali del tessuto in un sale, il blu MTT di formazan, misurato quantitativamente dopo l'estrazione dai tessuti (16). Le sostanze chimiche che non richiedono classificazione né etichettatura in base al sistema GHS dell'ONU/CLP («senza categoria») sono identificate come quelle che non provocano una diminuzione della vitalità dei tessuti al di sotto di una determinata soglia (ossia, vitalità del tessuto > 60 %, nelle prove EpiOcular™ EIT e SkinEthic™ HCE EITL ([3]), o > 50 %, nella prova SkinEthic™ HCE EITS ([4])) (cfr. il paragrafo 44).

DIMOSTRAZIONE DELLA COMPETENZA DI LABORATORIO

22. Prima di utilizzare come test di routine le prove su RhCE a fini regolamentari, i laboratori sono tenuti a dimostrare la loro competenza tecnica classificando correttamente le 15 sostanze per la verifica della competenza elencate nella tabella 1. Tali sostanze chimiche sono state selezionate sulla base delle sostanze chimiche utilizzate negli studi di validazione dei VRM (8) (10) (11). La selezione comprende, nei limiti del possibile, le sostanze chimiche che: i) si presentano in diversi stati fisici; ii) rappresentano la gamma completa di reazioni *in vivo* di irritazione oculare/grave lesione oculare in base ai risultati di alta qualità ottenuti con la prova *in vivo* sugli occhi dei conigli (metodo di prova B.5) (2)(14) e del sistema di classificazione UN GHS (ossia le categorie 1, 2A, 2B, o «senza categoria») (1) e del sistema di classificazione CLP (ossia le categorie 1, 2 o «senza categoria»); iii) coprono i diversi criteri di classificazione *in vivo* (24) (25); iv) sono rappresentative delle classi chimiche usate nello studio di validazione (8)(10)(11); v) rappresentano una grande varietà di gruppi funzionali organici (8) (10) (11); vi) hanno una struttura chimica ben definita (8) (10) (11); vii) sono colorate e/o riduttori diretti dell'MTT; viii) hanno prodotto risultati riproducibili nel corso della validazione dei metodi di prova sul RhCE; ix) sono state correttamente classificate dai metodi di prova sul RhCE durante la loro validazione; x) coprono l'intera gamma di risposte *in vitro* in base a dati di alta qualità provenienti da metodi di prova sul RhCE (vitalità 0-100 %); xi) sono disponibili in commercio; e xii) non sono eccessivamente costose da acquisire e/o smaltire. Nelle situazioni in cui una delle sostanze elencate non sia disponibile o non possa essere utilizzata per altri motivi giustificati, può essere utilizzata un'altra sostanza chimica che soddisfi i criteri sopra descritti, ad es. selezionata tra le sostanze chimiche utilizzate nella validazione del VRM. Una tale modifica deve tuttavia essere giustificata.

Tabella 1

Elenco delle sostanze chimiche per la verifica della competenza tecnica

Denominazione chimica	N. CAS	Gruppo organico funzionale ([1])	Stato fisico	Prestazione del VRM1 (%) ([2])	Prestazione del VRM2 (%) ([3])	Predizione del VRM	Riduttore dell'MTT	Interferenza di colori
Categoria in vivo 1 ([4])								
Metil tioglicolato	2365-48-2	Estere di acido carbossilico tioalcol	L	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	Non è possibile fare previsioni	Sì (elevato)	No
Acrilato di idrossietile	818-61-1	Acrilato; Alcol	L	7,5 ± 4,7 ([5])	1,6 ± 1,0	Non è possibile fare previsioni	No	No
2,5-Dimetil-2,5-esandiolo	110-03-2	Alcol	S	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	Non è possibile fare previsioni	No	No
Ossalato di sodio	62-76-0	Acido carbossilico	S	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	Non è possibile fare previsioni	No	No
***Categoria in vivo* 2A** ([4])								
di-D-gluconato, composto di N,N″-bis(4-clorofenil)-3,12-diimino- 2,4,11,13-tetraazatetradecane-diimidamide (20 %, acquoso) ([6])	18472-51-0	Alogenuro aromatico eterociclico; alogenuro di arile; gruppo diidrossile; guanidina	L	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	Non è possibile fare previsioni	No	Sì (debole)

([3]) EITL: EIT per i liquidi nel caso di SkinEthic™ HCE
([4]) EITS: EIT per i solidi nel caso di SkinEthic™ HCE

Denominazione chimica	N. CAS	Gruppo organico funzionale (1)	Stato fisico	Prestazione del VRM1 (%) (2)	Prestazione del VRM2 (%) (3)	Predizione del VRM	Riduttore dell'MTT	Interferenza di colori
Benzoato di sodio	532-32-1	Arile; Acido carbossilico	S	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	Non è possibile fare previsioni	No	No
Categoria in vivo 2B (4)								
Dietil-toluammide	134-62-3	Benzammide	L	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	Non è possibile fare previsioni	No	No
2,2-dimetil-3-metilenbiciclo[2.2.1]eptano	79-92-5	Alcano, ramificato con carbonio terziario; Alchene; Biciclooeptano; composti carbociclici ad anello reticolati cicloalcani	S	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	Non è possibile fare previsioni	No	No
***In Vivo* Senza categoria** (4)								
1-Etil-3-metilimidazolio etilsolfato	342573-75-5	Alcossi; Sale di ammonio; Arile; imidazolo; solfato	L	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Senza cat.	No	No
Etere dicaprilico	629-82-3	Alcossi; etere	L	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Senza cat.	No	No
Piperonil butossido	51-03-6	Alcossi; benzodiossolo; benzile; etere	L	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Senza cat.	No	No
Polietilenglicole (PRG-40); Olio di ricino idrogenato	61788-85-0	acile; alcol; allile; etere	Viscoso	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Senza cat.	No	No
1-(4-Clorofenil)-3-(3,4-diclorofenil)urea	101-20-2	Alogenuro aromatico eterociclico; alogenuro di arile; derivati dell'urea	S	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,-6	Senza cat.	No	No
2,2′-metilene-bis-6-(2H-benzotriazolo-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenolo	103597-45-1	Alcano, ramificato con carbonio quaternario; Composto carbociclico aromatico; eterocicli saturi policiclici; precursori di composti di quinone; terz-butile	S	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	Senza cat.	No	No

Denominazione chimica	N. CAS	Gruppo organico funzionale (1)	Stato fisico	Prestazione del VRM1 (%) (2)	Prestazione del VRM2 (%) (3)	Predizione del VRM	Riduttore dell'MTT	Interferenza di colori
Tetrafluoroborato di potassio	14075-53-7	Sale inorganico	S	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Senza cat.	No	No

Abbreviazioni:

N. CAS (*Chemical Abstracts Service Registry Number*) = Numero CAS (numero di registrazione nell'inventario europeo delle sostanze chimiche). GHS dell'ONU = Sistema mondiale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (1); VRM1 = «metodo di riferimento validato», EpiOcular™ EIT; VRM2 = «metodo di riferimento validato», SkinEthic™ HCE EIT; Interferenza di colori = interferenza di colere con la misurazione dell'assorbanza standard (densità ottica - OD) dell'MTT formazan.

(1) Gruppo funzionale organico determinato secondo l'analisi nidificata con il Toolbox 3.1 dell'OCSE (8).

(2) Sulla base dei risultati ottenuti con EpiOcular™ EIT nello studio di validazione dei metodi di prova per l'irritazione oculare di EURL ECVAM/Cosmetics Europe (EIVS) (8).

(3) Sulla base dei risultati ottenuti con SkinEthic™ HCE EIT nello studio di validazione (10)(11).

(4) Sulla base dei risultati della prova *in vivo* sugli occhi del coniglio (metodo di prova B.5/linea guida dell'OCSE n. 405) (2) (14) e del sistema GHS dell'ONU.

(5) Sulla base dei risultati ottenuti nello studio relativo alla strategia sperimentale del CONsortium CEFIC per le prove *in vitro* di irritazione oculare (CON4EI).

(6) La classificazione nelle categorie 2A o 2B dipende dall'interpretazione del criterio del GHS dell'ONU inteso a distinguere queste due categorie, ossia la constatazione degli effetti il settimo giorno in 1 animali su 3 oppure 2 animali su 3 per determinare la classificazione nella categoria 2A. Lo studio *in vivo* è stato condotto su 3 animali. Tutti gli endpoint, tranne l'opacità della cornea in un animale, erano scomparsi il giorno 7 o prima. L'unico animale in cui gli effetti non erano completamente scomparsi il giorno 7 presentava un punteggio pari a 1 (il giorno 7) per l'opacità della cornea; gli effetti erano scomparsi al giorno 9.

23. Nell'ambito della dimostrazione della competenza tecnica, si raccomanda agli utilizzatori di verificare le proprietà di barriera dei tessuti dopo averli ricevuti, in conformità delle specifiche del produttore del modello di tessuto RhCE (cfr. i paragrafi 25, 27 e 30). Tale verifica è particolarmente importante se i tessuti vengono trasportati per lunghe distanze/per viaggi lunghi. Quando una prova è consolidata e la sua correttezza d'impiego è stata dimostrata, non è più necessario effettuare la verifica in maniera sistematica. Tuttavia, se una prova viene utilizzata correntemente, si raccomanda di continuare a verificare le proprietà di barriera a intervalli regolari.

PROCEDURA

24. Le prove che attualmente rientrano nel presente metodo di prova sono le prove scientificamente valide EpiOcular™ EIT e SkinEthic™ HCE EIT (9)(12)(13), denominate «metodo di riferimento validato» (rispettivamente VRM1 e VRM2). Le procedure operative standard per i metodi di prova sul RhCE sono disponibili e dovrebbero essere applicate quando si eseguono questi metodi di prova in laboratorio (34) (35). Nei paragrafi che seguono e nell'appendice 2 è fornita una descrizione dei principali elementi e le procedure dei metodi di prova sul RhCE.

COMPONENTI DEI METODI DI PROVA SUL RHCE

Condizioni generali

25. Cellule derivate da cellule umane devono essere utilizzate per ricostituire un modello tridimensionale di tessuto epiteliale della cornea, che deve essere composto di cellule progressivamente stratificate ma non cheratinizzate. Il costrutto di tessuto RhCE è preparato in piastre di coltura con una membrana sintetica porosa attraverso la quale i nutrienti possono raggiungere le cellule. Il modello di epitelio corneale ricostituito è formato da diversi strati di cellule epiteliali vitali e non cheratinizzate. Il costrutto di RhCE presenta superficie epiteliale a diretto contatto con l'aria, in modo che l'esposizione locale diretta alle sostanze chimiche avvenga in modo simile a come avverrebbe l'esposizione di un epitelio corneale *in vivo*. Il costrutto di tessuto RhCE deve formare una barriera funzionale solida capace di resistere alla penetrazione rapida delle sostanze di riferimento citotossiche, ad esempio, sodio dodecil solfato (SDS) o Triton X-100. La funzione di barriera deve essere dimostrata e può essere valutata determinando il tempo di esposizione necessario per ridurre la vitalità tessutale del 50 % (ET_{50}) a seguito dell'applicazione di una sostanza di riferimento a una concentrazione fissa predeterminata (ad es. 100 µl allo 0,3 % (v/v) Triton X-100), oppure la concentrazione alla quale una sostanza di riferimento riduce la vitalità dei tessuti del 50 % (IC_{50}) dopo un tempo di esposizione fisso (ad es. 30 minuti di trattamento con 50 µl di SDS) (cfr. il paragrafo 30). Le proprietà di contenimento del costrutto tessutale RhCE devono essere tali da impedire che la sostanza chimica in esame possa passare attorno ai tessuti vitali, il che inciderebbe negativamente sulla qualità della modellizzazione dell'esposizione corneale. Le cellule di origine umana utilizzate nel modello di RhCE devono essere esenti da contaminazione da batteri, virus, micoplasmi o funghi. Il fornitore deve verificare la sterilità del costrutto di tessuto e l'assenza di contaminazione da funghi o batteri.

Condizioni funzionali

Vitalità

26. La prova utilizzata per la determinazione della vitalità è il test dell'MTT (16). Le cellule vitali del costrutto tessutale RhCE riducono il colorante vitale MTT in un precipitato di formazan blu, che è successivamente estratto dal tessuto

con solvente (isopropanolo o simile). L'estratto di formazan può essere quantificato mediante misurazione standard dell'assorbanza (densità ottica, OD) o analisi con spettrofotometria HPLC/CLUP (36). La densità ottica (OD) del solo solvente di estrazione dovrebbe essere sufficientemente bassa, ossia OD < 0,1. Gli utilizzatori del modello RhCE devono accertarsi che ciascun lotto del costrutto di tessuto RhCE impiegato soddisfi i criteri definiti per il controllo negativo. Gli intervalli di accettabilità dei valori OD del controllo negativo per i VRM sono indicati nella tabella 2. Gli utilizzatori della spettrofotometria HPLC/CLUP dovrebbero utilizzare gli intervalli di valori OD del controllo negativo di cui alla tabella 2, come criteri di accettabilità per il controllo negativo. Occorre documentare nella relazione sull'esecuzione della prova che i tessuti trattati con la sostanza di controllo negativo sono stabili in coltura (ossia presentano misurazioni di vitalità tessutale simili) nel corso del periodo di esposizione. Una procedura analoga dovrebbe essere seguita dal produttore di un tessuto nell'ambito del controllo di qualità dei lotti di tessuto, ma in questo caso i criteri di accettabilità sono diversi da quelli specificati nella tabella 2. Lo sviluppatore/il fornitore del costrutto tessutale RhCE deve stabilire un intervallo di accettabilità (limite superiore e inferiore) per i valori OD del controllo negativo (alle condizioni del metodo di prova per il controllo di qualità).

Tabella 2

Intervalli di accettabilità dei valori OD del controllo negativo (per gli utilizzatore della prova)

Prova	Limite inferiore di accettabilità	Limite superiore di accettabilità
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (protocolli per le sostanze sia solide che liquide)	> 0,8 ([1])	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (protocolli per le sostanze sia solide che liquide)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Tale intervallo di accettabilità tiene conto della possibilità di estendere la durata del trasporto/stoccaggio (cioè, > 4 giorni), che, secondo quanto dimostrato, non incidono sulla prestazione del metodo di prova (37).

Funzione di barriera

27. Il costrutto tessutale RhCE deve essere sufficientemente spesso e robusto da resistere alla penetrazione rapida delle sostanze di riferimento citotossiche, valutata dai fattori ET_{50} (Triton X-100) o IC_{50} (SDS) (tabella 3). La funzione di barriera di ciascun lotto del modello del RhCE è dimostrata dallo sviluppatore/fornitore del tessuto RhCE al momento della fornitura dei tessuti all'utilizzatore finale (cfr. il paragrafo 30).

Morfologia

28. L'esame istologico del RhCE dovrebbe evidenziare una struttura simile a quella dell'epitelio della cornea umana (compresi almeno 3 strati di cellule epiteliali vitali e una superficie non cheratinizzata). Per i VRM, la morfologia adeguata è stata dimostrata dallo sviluppatore/fornitore e non è dunque necessario dimostrare nuovamente ogni volta che il metodo di prova viene eseguito su un nuovo lotto.

Riproducibilità

29. I risultati del controllo positivo (PC) e dei controlli negativi (NC) del metodo devono mostrare riproducibilità nel tempo.

Controllo di qualità (QC)

30. Il costrutto tessutale RhCE deve essere utilizzato soltanto se lo sviluppatore/fornitore ha dimostrato che ogni lotto del costrutto di tessuto RhCE utilizzato rispetta determinati criteri di fabbricazione, i più rilevanti dei quali sono quelli relativi alla vitalità (cfr. il paragrafo 26) e alla funzione di barriera (cfr. il paragrafo 27). Lo sviluppatore/il fornitore del costrutto tessutale RhCE deve stabilire un intervallo di accettabilità (limite superiore e inferiore) per le funzioni di barriera, misurate mediante ET_{50} o IC_{50} (cfr. i paragrafi 25 e 26). L'intervallo di accettabilità per i valori ET_{50} e IC_{50} scelti come criteri per il controllo di qualità del lotto dallo sviluppatore/fornitore del costrutto tessutale RhCE (utilizzato nei VRM), è riportato nella tabella 3. Lo sviluppatore/fornitore del costrutto tessutale RhCE deve fornire dati che dimostrino la conformità con tutti i criteri di produzione agli utilizzatori del presente metodo di prova, in maniera che possano includere tali informazioni nella relazione sull'esecuzione della prova. Solo i risultati ottenuti con tessuti che soddisfano tutti i criteri di fabbricazione definiti possono essere accettati per una previsione affidabile sulle sostanze chimiche che non richiedono classificazione né etichettatura per irritazione oculare o gravi lesioni oculari secondo il sistema GHS dell'ONU/CLP.

Tabella 3

Criteri di controllo della qualità dei lotti

Prova	Limite inferiore di accettabilità	Limite superiore di accettabilità
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl di Triton X-100 allo 0,3 % (v/v))	ET_{50} = 12,2 min	ET_{50} = 37,5 min
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (30 minuti di trattamento con 50 µl SDS)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Applicazione della sostanza chimica in esame e delle sostanze di controllo

31. Per ogni sostanza chimica in esame e per ciascuna sostanza di controllo in ciascuna batteria di prove devono essere utilizzate almeno due repliche di tessuto. Si seguono due diversi protocolli di trattamento per le sostanze chimiche in esame, uno per le sostanze liquide e uno per le sostanze solide (34) (35). In entrambi i metodi e i protocolli, la superficie del costrutto tessutale deve essere umidificata con tampone fosfato salino di Dulbecco senza sale di calcio e magnesio (DPBS privo di Ca^{2+}/Mg^{2+}-free DPBS), prima di essere esposta alla sostanza chimica in esame, in modo da riprodurre il più fedelmente possibile l'umidità dell'occhio umano. Il trattamento dei tessuti inizia con l'esposizione alla sostanza o sostanze chimiche in esame e alle sostanze di controllo. Nei due protocolli di entrambi i VRM occorre applicare una quantità della sostanza in esame o di controllo sufficiente per coprire uniformemente la superficie epiteliale, evitando tuttavia di utilizzare una dose infinita (cfr. i paragrafi 32 e 33) (appendice 2).

32. Le sostanze chimiche in esame che possono essere applicate con pipetta a 37 °C o a temperature inferiori (con l'ausilio di una pipetta a stantuffo, se necessario) sono trattate come liquidi nei VRM. In caso contrario, devono essere trattate come solidi (cfr. il paragrafo 33). Nei VRM, la sostanza chimica in esame è applicata uniformemente sulla superficie del tessuto (cioè un'applicazione di almeno 60 µl/cm^2) (cfr. l'appendice 2 (33) (34)). Si dovrebbero evitare, per quanto possibile, effetti di capillarità (effetti di tensione superficiale) che possano essere osservati a motivo dei limitati volumi applicati agli inserti (sulla superficie tessutale), al fine di garantire il corretto dosaggio sui tessuti. I tessuti trattati con sostanze chimiche liquide sono incubati per 30 minuti in condizioni di coltura [37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % di umidità relativa (UR)]. Al termine del periodo di esposizione, la sostanza in esame liquida e le sostanze di controllo vengono rimosse con cura dalla superficie del tessuto mediante risciacquo abbondante con DPBS privo di Ca^{2+}/Mg^{2+} a temperatura ambiente. Questa fase di risciacquo è seguita da un'immersione post-esposizione in un nuovo mezzo di coltura a temperatura ambiente (per eliminare eventuale sostanza in esame assorbita dal tessuto) per un periodo prestabilito che varia in funzione del VRM utilizzato. Solo nel caso del VRM1, l'incubazione post-trattamento in nuovo mezzo di coltura a condizioni di coltura standard, è applicata prima di effettuare il test dell'MTT [cfr. l'appendice 2 (34) (35)].

33. Le sostanze chimiche in esame che non possono essere applicate con pipetta a 37 °C o a temperature inferiori sono trattate come solidi nei VRM. La quantità applicata deve essere sufficiente a coprire completamente la superficie di tessuto, corrispondente cioè a un'applicazione di almeno 60 mg/cm^2 (appendice 2). Quando possibile, i solidi dovrebbero essere testati sotto forma di polvere fine. I tessuti trattati con le sostanze chimiche in esame solide devono essere incubati per un periodo predefinito (in funzione del VRM utilizzato) in condizioni di coltura standard [cfr. l'appendice 2 (34) (35)]. Al termine del periodo di esposizione, la sostanza in esame solida e le sostanze di controllo vengono rimosse con cura dalla superficie del tessuto mediante risciacquo abbondante con DPBS privo di Ca^{2+}/Mg^{2+} a temperatura ambiente. Questa fase di risciacquo è seguita da un'immersione post-esposizione in un nuovo mezzo di coltura a temperatura ambiente (per eliminare eventuale sostanza in esame assorbita dal tessuto) per un periodo prestabilito che varia in funzione del VRM utilizzato, e dall'incubazione post-esposizione in nuovo mezzo di coltura a condizioni di coltura standard, prima di effettuare il test dell'MTT [cfr. l'appendice 2 (34) (35)].

34. Controlli negativi e positivi concomitanti sono inclusi in ciascuna batteria di prove per dimostrare che la vitalità (determinata con il controllo negativo) e la sensibilità (determinata con il controllo positivo) dei tessuti rientrano in un definito intervallo storico di accettabilità. Il controllo negativo permette anche di stabilire il valore di riferimento (vitalità tessutale al 100 %) da cui è calcolata la vitalità relativa (in percentuale) dei tessuti trattati con la sostanza chimica in esame (%Vitalità$_{test}$). La sostanza raccomandata per il controllo positivo da utilizzare nei VRM è l'acetato di metile puro (N. CAS 79-20-9, disponibile in commercio presso, ad es., Sigma-Aldrich, Cat. n. 45997; liquido). Le sostanze raccomandate per il controllo negativo da utilizzare nel VRM1 e nel VRM2 sono, rispettivamente, l'H_2O ultrapura e il DPBS privo di Ca^{2+}/Mg^{2+}. Queste sostanze sono utilizzate come controlli in studi di pre-validazione e validazione dei VRM, e sono quelle per le quali esistono più dati storici. L'uso di adeguate sostanze alternative per i controlli positivi e negativi deve essere debitamente giustificato scientificamente. I controlli positivi e negativi devono essere testati secondo il medesimo o i medesimi protocolli utilizzati per le sostanze chimiche in esame incluse nella batteria di prove (cioè, per liquidi e solidi). Questa applicazione è seguita da un trattamento mediante esposizione, da un risciacquo, da un'immersione post-trattamento, e da un'incubazione post-trattamento se del caso, come descritto per le batterie di controllo contestuali alle sostanze chimiche in esame liquide (cfr. il paragrafo 32) o le batterie di controllo contestuali alle sostanze chimiche in esame solide (cfr. il paragrafo 33), prima di effettuare il test dell'MTT (cfr. il paragrafo 35) (34) (35). Una singola serie di controlli negativi e positivi è sufficiente per tutte le sostanze chimiche in esame nello stesso stato fisico (liquido o solido).

Misurazione della vitalità dei tessuti

35. Il test dell'MTT è un metodo quantitativo standardizzato (16) che dovrebbe essere utilizzato per misurare la vitalità dei tessuti nell'ambito del presente metodo di prova. È compatibile con l'utilizzo di un costrutto tessutale tridimensionale. Il test dell'MTT è eseguito immediatamente dopo il periodo di incubazione post-trattamento. Nei VRM, l'RhCE è immerso in 0,3 ml di soluzione MTT a 1 mg/ml per 180 ± 15 minuti in condizioni di coltura standard. Il colorante vitale MTT è ridotto a un precipitato di MTT formazan dalle cellule vitali del costrutto tessutale RhCE. Il precipitato di formazan blu è successivamente estratto dal tessuto mediante un adeguato volume di solvente (isopropanolo o simile) (34)(35). Per tessuti esposti a sostanze chimiche in esame liquide, l'estrazione è effettuata da strati sia inferiori sia superiori dei tessuti, mentre per i tessuti esposti alle sostanze in esame solide e a liquidi colorati, l'estrazione è effettuata soltanto dallo strato inferiore del tessuto (per ridurre al minimo qualsiasi potenziale rischio di contaminazione della soluzione di isopropanolo usata per l'estrazione con un eventuale residuo della sostanza chimica in esame presente nel tessuto). Anche nel caso di tessuti esposti a sostanze chimiche liquide difficili da risciacquare, l'estrazione può essere effettuata soltanto dallo strato inferiore di tessuto. Le sostanze di controllo positive e negative testate in parallelo sono trattate allo stesso modo delle sostanze chimiche in esame. L'MTT formazan estratto è quantificato mediante misurazione dell'assorbanza standard (DO) a 570 nm con un filtro passa-banda di larghezza massima di ± 30 nm, oppure mediante spettrofotometria HPLC/CLUP (cfr. il paragrafo 42) (11) (36).

36. Le proprietà ottiche della sostanza chimica in esame o la sua azione chimica sull'MTT potrebbero interferire con la misurazione dell'MTT formazan, portando a una stima errata della vitalità dei tessuti. Le sostanze chimiche in esame possono interferire con il test dell'MTT mediante riduzione diretta dell'MTT in blu di formazan, e/o mediante interferenza dei colori se la sostanza in esame assorbe, naturalmente o a seguito di trattamento, nello stesso spettro di OD del formazan (cioè, circa 570 nm). Vanno effettuate verifiche preliminari prima della prova, al fine di individuare le sostanze che sono potenziali riduttori diretti dell'MTT e/o che causano interferenze nei colori, e sono preparati controlli supplementari per individuare le interferenze che possono essere causate da tali sostanze chimiche e correggere la prova di conseguenza (cfr. i paragrafi 37-41). Ciò è particolarmente importante quando la sostanza in esame non è stata rimossa completamente dal modello di RhCE mediante risciacquo o quando penetra nel modello di epitelio corneale ed è, quindi, presente nel costrutto tessutale RhCE al momento dell'esecuzione del test dell'MTT. Per le sostanze chimiche in esame che assorbono la luce nello stesso spettro dell'MTT formazan (naturalmente o a seguito di trattamento), e che sono incompatibili con la misurazione dell'assorbanza (OD) del formazan a motivo di un'eccessiva interferenza (assorbanza che raggiunge 570 ± 30 nm), può essere effettuata una procedura analitica mediante spettrofotometria HPLC/CLUP per misurare la presenza di formazan (cfr. i paragrafi 41 e 42) (11) (36). Per una descrizione dettagliata di come individuare e correggere la riduzione diretta dell'MTT e le interferenze da parte degli agenti coloranti consultare le procedure operative standard dei VRM (34)(35). Un diagramma di flusso illustrativo e orientativo della procedura per identificare e trattare le sostanze chimiche in esame riduttrici dirette dell'MTT e/o che provocano un'interferenza di colori nei VRM1 e VRM2 figura, rispettivamente, nelle appendici 3 e 4.

37. Per individuare eventuali interferenze dovute alle sostanze chimiche in esame che assorbono nello stesso spettro del formazan (naturalmente o a seguito di trattamento) e stabilire se sono necessari controlli aggiuntivi, la sostanza chimica in esame è addizionata di acqua e/o isopropanolo e incubata per un periodo adeguato a temperatura ambiente (cfr. l'appendice 2) (34) (35). Se la sostanza chimica in esame in acqua e/o isopropanolo assorbe sufficiente luce ad una lunghezza d'onda di 570 ± 20 nm per VRM1 (cfr. l'appendice 3), o se si ottiene una soluzione colorata mescolando la sostanza chimica in esame con acqua per il VRM2 (cfr. l'appendice 4), si ritiene che la sostanza chimica in esame interferisca con la misurazione dell'assorbanza (DO) del formazan; in tal caso devono essere preparati controlli colorati supplementari oppure, in alternativa, si procede all'analisi mediante spettrofotometria HPLC/CLUP, nel qual caso non sono necessari controlli supplementari (cfr. i paragrafi 41 e 42 e le appendici 3 e 4) (34) (35). Quando si effettuano le misurazioni dell'assorbanza standard (OD), ciascuna sostanza chimica in esame che interferisce con la prova è applicata su almeno due repliche di tessuti vitali, che sono sottoposte all'intera procedura sperimentale ma sono incubate nel mezzo anziché in soluzione MTT durante la fase di incubazione con MTT, al fine di generare un controllo di colore non specifico in tessuti vivi (NSC_{living}) (34) (35). Il controllo NSC_{living} deve essere testato in parallelo alla prova sulla sostanza chimica in esame colorata e, in caso di prova multipla, deve essere effettuato un controllo NSC_{living} indipendente per ciascuna prova (di ciascuna batteria di prove) per tener conto della variabilità biologica intrinseca dei tessuti vivi. La vitalità reale dei tessuti è calcolata come segue: la percentuale di vitalità dei tessuti ottenuta nei tessuti vivi, esposti a sostanze chimiche che causano interferenze e incubate con soluzione MTT ($\%Vitalità_{test}$) meno la percentuale di colore non specifico ottenuta nei tessuti vivi esposti a sostanze chimiche che causano interferenze e incubate in mezzo privo di MTT, in parallelo alla prova da correggere ($\%NSC_{living}$), cioè la vitalità reale dei tessuti = [$\%Vitalità_{test}$] - [$\%NSC_{living}$].

38. Per individuare i riduttori diretti dell'MTT, occorre aggiungere ciascuna sostanza chimica in esame a una soluzione di MTT appena preparata. Una quantità adeguata della sostanza chimica in esame è aggiunta a una soluzione MTT e la miscela è incubata per circa 3 ore in condizioni di coltura standard (cfr. le appendici 3 e 4) (34) (35). Se la miscela di MTT e della sostanza chimica in esame (o la sospensione nel caso di sostanze chimiche insolubili) diventa blu/viola, si ritiene che la sostanza chimica in esame è un riduttore diretto dell'MTT e sono necessarie ulteriori verifiche funzionali su costrutto di tessuto RhCE non vitale, indipendentemente dalla scelta di misurare l'assorbanza (OD) o di procedere ad analisi mediante spettrofotometria HPLC/CLUP. Tale ulteriore verifica funzionale è eseguita su tessuti uccisi che presentano solo un'attività metabolica residuale, ma assorbono e trattengono la sostanza chimica in esame in proporzioni simili ai tessuti vitali. In VRM1, i tessuti uccisi sono preparati mediante esposizione a basse temperature («uccisi per congelamento»). In VRM2, i tessuti uccisi sono preparati mediante un lungo periodo di incubazione (almeno 24 ± 1 ore) in acqua, seguito da conservazione a bassa temperatura («uccisi in acqua»). Ciascuna sostanza chimica in esame che riduce l'MTT è applicata su almeno due repliche di tessuti uccisi, che sono sottoposte all'intera procedura sperimentale per generare un controllo di riduzione non specifico dell'MTT (NSMTT) (34) (35). È sufficiente un solo controllo NSMTT per ciascuna sostanza chimica in esame, a prescindere dal numero di prove/batterie di prove indipendenti eseguite. La vitalità reale dei tessuti è calcolata come segue: la percentuale di vitalità dei tessuti ottenuta nei tessuti vivi, esposti al riduttore dell'MTT ($\%Vitalità_{test}$) meno la percentuale del riduttore dell'MTT ottenuta nei tessuti uccisi esposti al medesimo riduttore dell'MTT e calcolati in proporzione del controllo negativo testato, in parallelo alla prova da correggere (%NSC), cioè la vitalità reale dei tessuti = [$\%Vitalità_{test}$] - [%NSC].

39. Nel caso delle sostanze chimiche che sono state individuate quali sostanze in grado di causare interferenze di colori (cfr. il paragrafo 37) e la riduzione diretta dell'MTT (cfr. il paragrafo 38), si rende necessario un terzo gruppo di controlli quando si esegue la misurazione dell'assorbanza standard (OD), in aggiunta ai controlli NSMTT e NSC_{living} descritti nei paragrafi precedenti. In generale, questo caso si verifica per le sostanze chimiche di colore scuro che assorbono la luce nello spettro di 570 ± 30 nm (blu, viola e nero) in quanto il loro colore intrinseco impedisce di valutare il loro potenziale di riduzione diretta dell'MTT descritta al paragrafo 38. Ciò rende automaticamente obbligatori i controlli NSMTT in parallelo ai controlli NSC_{living}. Le sostanze chimiche in esame richiedono controlli sia NSMTT che NSC_{living} possono essere assorbiti e trattenuti sia dai tessuti vivi che da quelli uccisi. Pertanto, in tal caso l'uso del controllo NSMTT può permettere di correggere la prova non solo in funzione del potenziale di

riduzione diretta dell'MTT della sostanza chimica in esame, ma anche dell'interferenza di colore derivante dall'assorbimento e dal trattenimento della sostanza chimica in esame da parte dei tessuti uccisi. Ciò può portare a una doppia correzione dell'interferenza di colori, dato che il controllo NSC_{living} consente già di tener conto dell'interferenza di colori dovuta all'assorbimento e al trattenimento della sostanza chimica in esame da parte dei tessuti vivi. Per evitare una doppia correzione dell'interferenza di colori, deve essere effettuato un terzo controllo per colore non specifico nei tessuti uccisi (NSC_{killed}) (cfr. le appendici 3 e 4) (34) (35). In tale controllo supplementare, ciascuna sostanza chimica in esame è applicata su almeno due repliche di tessuti uccisi, che sono sottoposte all'intera procedura sperimentale ma sono incubate nel mezzo anziché in soluzione MTT durante la fase di incubazione con MTT. È sufficiente un solo controllo NSC_{killed} per ciascuna sostanza chimica in esame, a prescindere dal numero di prove/batterie di prove indipendenti eseguite, ma dovrebbe essere condotto in parallelo al controllo NSMTT e sul medesimo lotto di tessuti. La vitalità reale dei tessuti è calcolata come segue: la percentuale di vitalità dei tessuti ottenuta nei tessuti vivi esposti alla sostanza chimica in esame (%$Vitalità_{test}$) meno %NSMTT meno %NSC_{living} più la percentuale di colore non specifico ottenuta nei tessuti uccisi esposti alla sostanza in esame che causa un'interferenza e incubati nel mezzo senza MTT, calcolata in proporzione del controllo negativo testato, in parallelo alla prova da correggere (%NSC_{killed}), cioè la vitalità reale dei tessuti = [%$Vitalità_{test}$] - [%NSMTT] - [%NSC_{living}] + [%NSC_{killed}].

40. È importante notare che la riduzione non specifica dell'MTT e le interferenze non specifiche di colore possono aumentare l'OD (quando si eseguono le misurazioni di assorbanza standard) dell'estratto di tessuto al di sopra dell'intervallo di linearità dello spettrofotometro e che una riduzione non specifica dell'MTT può anche ampliare l'area di picco del formazan (quando si eseguono misurazioni mediante spettrofotometria HPLC/CLUP) dell'estratto tessutale al di sopra dell'intervallo di linearità dello spettrofotometro. È quindi importante che ciascun laboratorio determini l'intervallo di linearità del proprio spettrofotometro (per l'OD/area di picco) ad esempio mediante formazan, (n. CAS 57360-69-7), disponibile in commercio presso la società Sigma-Aldrich (Cat. n. M2003), prima di procedere alle prove sulle sostanze chimiche a fini regolamentari.

41. La misurazione dell'assorbanza standard (OD) mediante spettrofotometro risulta appropriata per valutare le sostanze chimiche che agiscono da riduttori diretti dell'MTT e causano interferenze di colori, quando l'interferenza osservata non è troppo forte rispetto alla misurazione dell'MTT formazan (cioè la densità ottica degli estratti di tessuto ottenuta per la sostanza chimica in esame senza correzione per tener conto della riduzione diretta dell'MTT e/o dell'interferenza di colori rientrano nell'intervallo di linearità dello spettrofotometro). Tuttavia, i risultati relativi alle sostanze chimiche in esame che producono %NSMTT e/o %NSC_{living} ≥ 60 % (in VRM1, e in VRM2 per il protocollo sui liquidi) o 50 % (VRM2 per il protocollo dei solidi) del controllo negativo devono essere utilizzati con cautela, in quanto tali soglie corrispondono a quelle stabilite nei VRM per distinguere tra sostanze chimiche rientranti in una categoria e quelle «senza categoria» (cfr. il paragrafo 44). Per contro, l'assorbanza standard (OD) non può essere misurata quando l'interferenza con la misurazione di MTT formazan è troppo forte (cioè se l'OD non corretta negli estratti di tessuto testati si situano al di fuori dell'intervallo di linearità dello spettrofotometro). Le sostanze chimiche in esame colorate o quelle che si colorano a contatto con l'acqua o l'isopropanolo, che interferiscano troppo con la misurazione dell'assorbanza standard (OD) dell'MTT formazan possono comunque essere valutate mediante spettrofotometria HPLC/CLUP (cfr. le appendici 3 e 4), il quanto il sistema HPLC/CLUP permette di separare l'MTT formazan dalla sostanza chimica prima della quantificazione (36). Per questo motivo, i controlli NSC_{living} o NSC_{killed} non sono mai necessari per l'analisi con spettrofotometria HPLC/CLUP, indipendentemente dalla sostanza chimica da testare. I controlli NSMTT sono tuttavia necessari se si prevede che la sostanza chimica in esame sia un riduttore diretto dell'MTT (seguendo la procedura descritta al paragrafo 38). I controlli NSMTT sono necessari anche per le sostanze chimiche in esame colorate (naturalmente o a contatto con l'acqua) il cui colore impedisce di valutare il loro potenziale di riduzione diretta dell'MTT, come descritto nel paragrafo 38. Quando si ricorre all'analisi con spettrofotometria HPLC/CLUP per misurare l'MTT formazan, la vitalità del tessuto è calcolata come percentuale dell'area di picco di MTT formazan ottenuta con tessuti vivi esposti alla sostanza chimica in esame rispetto all'area di picco dell'MTT formazan ottenuta con il controllo negativo concomitante. Per le sostanze chimiche in esame in grado di ridurre direttamente l'MTT, la vitalità reale dei tessuti è calcolata come segue: %$Vitalità_{test}$ meno %NSMTT, come descritto nell'ultima frase del paragrafo 38. Infine, va osservato che i riduttori dell'MTT diretti o i riduttori dell'MTT diretti che causano anche interferenze di colore, trattenuti nei tessuti dopo il trattamento e la cui capacità di riduzione MTT è tale da portare a valori dell'OD (utilizzando misurazioni dell'OD standard) o ad aree di picco (utilizzando la spettrofotometria HPLC/CLUP) degli estratti di tessuto in esame che si situano al di fuori dell'intervallo di linearità dello spettrofotometro, non possono essere valutati con i metodi di prova sul RhCE; si ritiene tuttavia che ciò avvenga solo in rare occasioni.

42. La procedura di misurazione mediante spettrofotometria HPLC/CLUP può essere utilizzata con tutti i tipi di sostanze chimiche in esame (colorate, non colorate, riduttori di MTT e non riduttori di MTT) ai fini della misurazione dell'MTT formazan (11) (36). Poiché esistono vari sistemi di spettrofotometria HPLC/CLUP, non è ipotizzabile che tutti gli utilizzatori riusciranno a riprodurre identiche condizioni per le attrezzature utilizzate. Per questo motivo, devono essere fornite prove dell'efficacia dell'apparecchiatura di spettrofotometria HPLC/CLUP prima di utilizzarla per quantificare l'MTT formazan negli estratti di tessuto, e devono essere rispettati i criteri di accettabilità per una serie di parametri standard di qualificazione sulla base dei parametri descritti nelle raccomandazioni della *Food and Drug Administration* statunitense per la validazione dei metodi di bio-analisi (36) (38). Questi parametri di base e loro criteri di accettazione figurano nell'appendice 5. Una volta che i criteri di accettabilità definiti nell'appendice 5 sono soddisfatti, l'apparecchiatura di spettrofotometria HPLC/CLUP è considerata qualificata e può essere utilizzata per misurare l'MTT formazan alle condizioni sperimentali descritte nel presente metodo di prova.

Criteri di accettabilità

43. Per ciascuna batteria di prove che utilizza lotti di tessuto RhCE che soddisfa i criteri del controllo di qualità (cfr. il paragrafo 30), i tessuti trattati con la sostanza di controllo negativo devono mostrare una densità ottica che rifletta la qualità dei tessuti sia dopo le fasi di spedizione e ricezione, sia durante l'applicazione di tutti i protocolli e devono situarsi entro i limiti storici descritti nella tabella 2 (cfr. il paragrafo 26). Analogamente, i tessuti trattati con la sostanza di controllo positivo (acetato di metile) devono presentare una vitalità tessutale < 50 % rispetto al controllo negativo nel VRM1 per il protocollo di liquidi o solidi, e ≤ 30 % (protocollo per i liquidi) o ≤ 20 % (protocollo per i solidi) rispetto al controllo negativo nel VRM2; tali valori riflettono la capacità dei tessuti di reagire a una sostanza chimica in esame irritante alle condizioni del metodo di prova (34)(35). La variabilità tra le repliche di tessuto per le sostanze chimiche in esame e le sostanze di controllo deve rientrare nei limiti accettabili (cioè, la differenza di vitalità tra due repliche di tessuti dovrebbe essere inferiore al 20 % oppure la deviazione standard tra tre repliche di tessuto non dovrebbe essere superiore al 18 %). Se uno dei controlli (positivo o negativo) in una batteria di prove si situa al di fuori degli intervalli accettabili, la batteria di prove deve essere considerata «non valida» e deve essere ripetuta. Se la variabilità tra le repliche di tessuto di una sostanza chimica si situa al di fuori dell'intervallo di valori accettabile, la prova deve essere considerata «non valida» e la sostanza chimica in esame deve essere nuovamente testata.

Interpretazione dei risultati e modello predittivo

44. I valori di OD dei controlli/aree di picco ottenuti con le repliche degli estratti di tessuto per ciascuna sostanza chimica in esame sono utilizzati per calcolare la percentuale media di vitalità dei tessuti (media tra le repliche di tessuto) rispetto alla vitalità del controllo negativo (fissata al 100 %). La tabella 4 riporta i valori limite della percentuale della vitalità tessutale per identificare le sostanze chimiche in esame che non richiedono classificazione per l'irritazione oculare o per gravi lesioni oculari («senza categoria» del GHS dell'ONU/CLP). Pertanto i risultati sono interpretati come segue:

— La sostanza chimica in esame è considerata sostanza che non richiede classificazione né etichettatura secondo il rientrano in nessuna categoria («senza categoria» secondo il sistema GHS dell'ONU/CLP) se la percentuale media di vitalità tessutale dopo l'esposizione e l'incubazione post-esposizione è superiore (>) al valore limite stabilito per la percentuale di vitalità del tessuto, come riportato nella tabella 4. In questo caso, non occorre procedere a prove supplementari con altri metodi di prova.

— Per contro, nessuna predizione è possibile se la percentuale media di vitalità tessutale dopo l'esposizione e l'incubazione post-esposizione è inferiore o uguale (≤) al valore limite stabilito per la percentuale di vitalità del tessuto, come riportato nella tabella 4. In questo caso, è necessario effettuare prove supplementari con altri metodi di prova, giacché i metodi di prova sul RhCE producono un numero significativo di falsi positivi (cfr. i paragrafi 14 e 15) e non permettono di distinguere tra le categorie 1 e 2 del GHS dell'ONU e CLP (cfr. il paragrafo 17).

Tabella 4

Modelli predittivi secondo la classificazione del sistema GHS dell'ONU e del regolamento CLP

VRM	Senza categoria	Non è possibile fare previsioni
VRM 1 - EpiOcular™ EIT (per entrambi i protocolli)	Vitalità tessutale media > 60 %	Vitalità tessutale media ≤ 60 %
VRM 2 - SkinEthic™ HCE EIT (per il protocollo dei liquidi)	Vitalità tessutale media > 60 %	Vitalità tessutale media ≤ 60 %
VRM2 - SkinEthic™ HCE EIT (per il protocollo dei solidi)	Vitalità tessutale media > 50 %	Vitalità tessutale media ≤ 50 %

45. Una singola prova costituita da almeno due repliche di tessuto dovrebbe essere sufficiente per una sostanza chimica in esame, se la classificazione che ne risulta è inequivocabile. Tuttavia, in caso di risultati inconclusivi, tra cui misurazioni discordanti delle repliche e/o una percentuale media della vitalità dei tessuti pari a 60±5 % (VRM1, e VRM2 per il protocollo dei liquidi) o 50±5 % (VRM2 per il protocollo dei solidi), si dovrebbe considerare l'opportunità di eseguire una seconda prova, oltre che una terza nell'eventualità di risultati discordanti tra le prime due prove.

46. È anche possibile utilizzare valori soglia di vitalità dei tessuti diversi per distinguere le sostanze chimiche che rientrano o non rientrano in una data categoria in casi particolari di miscele, se necessario e giustificato, in modo da migliorare le prestazioni complessive del metodo di prova per questi tipi di miscele (cfr. il paragrafo 14). Le sostanze chimiche di riferimento sono utili per valutare il potenziale di grave lesione oculare/irritazione oculare di sostanze chimiche o miscele sconosciute o per valutare il potenziale di irritazione oculare relativo di una sostanza chimica appartenente a una determinata classe di sostanze o prodotti chimici nell'ambito di una specifica gamma di risposte positive.

DATI E RELAZIONE

Dati

47. Per ciascuna prova, i dati ottenuti da singole repliche dei tessuti (ad esempio, i valori OD/aree di picco dell'MTT formazan e le percentuali di vitalità tessutale calcolate per ogni sostanza chimica in esame e per ogni controllo, compresa la previsione conclusiva del metodo di prova sul RhCE) sono presentati sotto forma di tabella per ciascuna sostanza chimica in esame, compresi i dati delle prove ripetute, se del caso. Inoltre, devono essere riportate la percentuale media della vitalità del tessuto e la differenza di vitalità tra due repliche di tessuto (se n = 2 repliche di tessuto) o la deviazione standard (se n ≥ 3 repliche di tessuto) per ogni sostanza chimica in esame e controllo. Eventuali interferenze con il test dell'MTT osservate per una sostanza chimica in esame a motivo di una riduzione diretta dell'MTT e/o di interferenza nei colori devono essere indicate per ciascuna sostanza chimica in esame.

Relazione sull'esecuzione della prova

48. La relazione sull'esecuzione della prova comprende le informazioni riportate di seguito.

Sostanza chimica in esame

Sostanza monocostituente:

— identificazione della sostanza chimica, mediante denominazioni quali IUPAC o CAS, il numero CAS, il codice SMILES o InChI, la formula di struttura e/o altri identificatori;

— stato fisico, volatilità, pH, LogP, peso molecolare, classe chimica e altre proprietà fisico-chimiche pertinenti per la realizzazione dello studio, secondo i dati disponibili;

— purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico, ecc.;

— trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione);

— condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili.

Sostanza multicostituente, UVCB e miscela:

— caratterizzazione, nella misura del possibile, ad esempio attraverso l'identità chimica (cfr. sopra), la purezza, le proporzioni quantitative e le proprietà fisico-chimiche pertinenti (cfr. sopra) dei costituenti, secondo i dati disponibili;

— stato fisico e altre proprietà fisico-chimiche pertinenti per la realizzazione dello studio, secondo i dati disponibili;

— purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico, ecc.;

— trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione);

— condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili.

Sostanze di controllo positive e negative

— identificazione della sostanza chimica, mediante denominazioni quali IUPAC o CAS, il numero CAS, il codice SMILES o InChI, la formula di struttura e/o altri identificatori;

— stato fisico, volatilità, peso molecolare, classe chimica e altre proprietà fisico-chimiche pertinenti per la realizzazione dello studio, secondo i dati disponibili;

— purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico, ecc.;

— trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione);

— condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;

— giustificazione dell'utilizzo di un controllo negativo diverso dall'acqua (H_2O) ultrapura o il DPBS privo di Ca 2+/Mg2+, se applicabile;

— giustificazione dell'utilizzo di un controllo positivo diverso dall'acetato di metile puro, se applicabile;

— riferimento ai dati storici relativi ai controlli positivi e negativi che dimostrano la conformità ai criteri di accettabilità.

Informazioni relative allo sponsor e al laboratorio sperimentale

— Nome e indirizzo dello sponsor, del centro di prova e del responsabile dello studio.

— *Costrutto tessutale RhCE e protocollo applicato (spiegazione dei motivi delle scelte operate, se del caso)*

Condizioni del metodo di prova

— Il costrutto tessutale RhCE utilizzato, compreso numero di lotto;

— lunghezza d'onda e larghezza di banda (se del caso) utilizzati per la quantificazione dell'MTT formazan, e intervallo di linearità degli apparecchi di misurazione (ad es. spettrofotometro);

— descrizione del metodo applicato per quantificare l'MTT formazan;

— descrizione del sistema di spettrofotometria-HPLC/CLUP utilizzato, se del caso;

— informazioni complete sul modello specifico tessuto RhCE utilizzato e sulla sua efficienza. Esse dovrebbero includere (elenco non esaustivo):

i) vitalità all'atto del controllo di qualità (fornitore);

ii) vitalità alle condizioni del metodo di prova (utilizzatore);

iii) funzione di barriera durante il controllo della qualità;

iv) morfologia, se informazioni disponibili;

v) riproducibilità e predittività;

vi) altri controlli di qualità (QC) del costrutto tessutale RhCE, in base alle informazioni disponibili;

— riferimenti a dati storici del costrutto tessutale RhCE, compresi (elenco non esaustivo): accettabilità dei dati di QC in relazione ai dati storici del lotto;

— dichiarazione di dimostrazione della competenza tecnica del laboratorio nell'applicazione del metodo di prova, prima della sua applicazione sistematica, sottoponendo a prova le sostanze di riferimento;

Criteri di accettabilità per la prova e le batterie di prove

— medie e intervalli di valori accettabili per i controlli positivi e negativi, basati su dati storici;

— variabilità accettabile tra le repliche di tessuto per i controlli positivi e negativi;

— variabilità accettabile tra le repliche di tessuto per la sostanza chimica in esame;

Procedura di prova

— dettagli della procedura di prova utilizzata;

— dosi delle sostanze chimiche in esame e delle sostanze di controllo utilizzate;

— durata e temperatura dei periodi di esposizione, di immersione post-esposizione e di incubazione post-esposizione (se del caso);

— descrizione delle eventuali modifiche apportate al protocollo sperimentale;

— indicazione dei controlli usati per riduttori dell'MTT diretti e/o sostanze chimiche in esame coloranti, se del caso;

— numero di repliche dei tessuti utilizzati per la sostanza chimica in esame e i controlli (controllo positivo, controllo negativo, NSMTT, NSC_{living} and NSC_{killed}, se del caso).

Risultati

— tabella dei dati per ciascuna sostanza chimica in esame e sostanza di controllo per ciascuna batteria di prove (compresi gli esperimenti ripetuti, se del caso) e per la misurazione di ciascuna replica, compresi i valori OD o l'area di picco dell'MTT formazan, la percentuale di vitalità dei tessuti, la percentuale media della vitalità dei tessuti, la differenza o la deviazione standard tra le repliche di tessuti e la previsione finale;

— se del caso, i risultati dei controlli effettuati per riduttori diretti dell'MTT e/o delle sostanze chimiche in esame colorate, compresi i valori OD o l'area di picco dell'MTT formazan, %NSMTT, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, la differenza o la deviazione standard tra le repliche di tessuti, la percentuale finale corretta di vitalità dei tessuti e la previsione finale;

— risultati ottenuti per la o le sostanze chimiche in esame e le sostanze di controllo in relazione ai criteri di accettabilità stabiliti per la prova e le batterie di prove;

— descrizione di altri effetti osservati, ad esempio la colorazione dei tessuti da parte di una sostanza chimica in esame colorata.

Discussione dei risultati

Conclusione

BIBLIOGRAFIA

(1) UN (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York and Geneva: United Nations. Disponibile all'indirizzo: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Capitolo B.5 del presente allegato, Irritazione/corrosione oculare acuta.

(3) Capitolo B.47 del presente allegato, Metodo di prova dell'opacità e della permeabilità della cornea nei bovini per l'identificazione di i) sostanze chimiche che inducono gravi lesioni oculari e ii) sostanze chimiche che non richiedono classificazione per irritazione oculare o gravi lesioni oculari.

(4) Capitolo B.48 del presente allegato, Metodo di prova sull'occhio isolato dei polli (Isolated Chicken Eye — ICE) per l'identificazione di i) sostanze chimiche che inducono gravi lesioni oculari e ii) sostanze chimiche che non richiedono classificazione.

(5) Capitolo B.61 del presente allegato, Metodo di prova di diffusione della fluoresceina per l'individuazione di sostanze corrosive e gravemente irritanti per gli occhi

(6) Capitolo B.68 del presente allegato, Metodo di prova di esposizione *in vitro* di breve durata per l'identificazione di i) sostanze chimiche che inducono gravi lesioni oculari e ii) sostanze chimiche che non richiedono classificazione per irritazione oculare o gravi lesioni oculari.

(7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2 010,261-266.

(8) EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28 125 EN; doi:10.2787/41680. Disponibile all'indirizzo: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280.

(9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28 173 EN; doi: 10.2787/043697. Disponibile all'indirizzo: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702.

(10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.

(11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.

(12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28 175 EN; doi: 10.2787/390390. Disponibile all'indirizzo: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704.

(13) EC EURL ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Manuscript in Preparation).

(14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. Journal of *Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.

(15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

(16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(17) OECD (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(18) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.

(20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for *in vitro* toxicology. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, pp. 147-159.

(21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619-626.

(22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1 476-1 488.

(23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.

(24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

(25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.

(26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.

(27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N.and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.

(28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.

(29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922–936.

(30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.

(31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115–130.

(32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2 610–2 625.

(33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41–54.

(34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Disponibile all'indirizzo: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

(35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Disponibile all'indirizzo: https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index.

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.

(37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.

(38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Disponibile all'indirizzo: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf.

(39) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Appendice 1

DEFINIZIONI

Accuratezza: grado di concordanza tra i risultati ottenuti con il metodo di prova e i valori di riferimento accettati. Misura l'efficienza del metodo di prova e costituisce un aspetto della pertinenza. Il termine è spesso utilizzato come sinonimo di "concordanza" per indicare la percentuale di risultati corretti di un metodo di prova (18).

Sostanza chimica di riferimento: sostanza chimica usata come standard di confronto rispetto a una sostanza chimica in esame. Una sostanza di riferimento dovrebbe presentare le seguenti proprietà: i) fonte o fonti coerenti e affidabili per la sua identificazione e caratterizzazione; ii) analogia strutturale, funzionale e/o chimica o analogia alla classe di prodotto della sostanza o delle sostanze in esame; iii) caratteristiche fisiche/chimiche note; iv) dati di supporto relativi agli effetti noti; e v) potenza nota nell'intervallo della reazione auspicata.

Approccio "dal basso": approccio graduale applicato a una sostanza chimica in esame che si presume non debba essere classificata né etichettata per irritazione oculare o grave lesione oculare, la cui prima fase consiste nel distinguere le sostanze chimiche che non richiedono classificazione né etichettatura (esito negativo) dalle altre sostanze chimiche (esito positivo).

Sostanza chimica: sostanza o miscela.

Concordanza: si veda "Accuratezza".

Cornea: parte trasparente frontale del bulbo oculare che copre l'iride e la pupilla e consente il passaggio della luce verso l'interno.

CV: coefficiente di variazione

Dev: Deviazione

EIT: (*Eye Irritation Test*) test di irritazione oculare.

EURL ECVAM: (*European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing*) Laboratorio di riferimento dell'Unione europea per le alternative alla sperimentazione animale.

Irritazione oculare: produzione di alterazioni nell'occhio in seguito all'applicazione di una sostanza chimica in esame sulla superficie anteriore dell'occhio, totalmente reversibili entro 21 giorni dall'applicazione. Sinonimo di "effetti reversibili sugli occhi" e di "categoria 2 del GHS dell'ONU".

ET_{50}: tempo di esposizione necessario per ridurre la vitalità dei tessuti del 50 % dopo l'applicazione di una sostanza chimica di riferimento ad una concentrazione fissa predeterminata.

Percentuale di falsi negativi: percentuale di tutte le sostanze positive erroneamente identificate come negative da un metodo di prova. È un indicatore dell'efficienza del metodo di prova.

Percentuale di falsi positivi: percentuale di tutte le sostanze negative erroneamente identificate come positive da un metodo di prova. È un indicatore dell'efficienza del metodo di prova.

Pericolo: la proprietà intrinseca di un agente o di una situazione che ha il potenziale di causare effetti nocivi se un organismo, un sistema o una (sotto)popolazione vi sono esposti.

HCE: epitelio corneale umano di SkinEthic™.

HPLC: cromatografia liquida ad alta prestazione.

IC_{50}: concentrazione alla quale una sostanza chimica di riferimento riduce la vitalità dei tessuti del 50 % dopo un tempo di esposizione fisso (ad es. 30 minuti di trattamento con SDS).

Dose infinita: quantità di sostanza chimica in esame applicata al costrutto tessutale RhCE che supera la quantità necessaria per coprire in maniera completa e uniforme la superficie epiteliale.

Effetti irreversibili sugli occhi: cfr. "Gravi lesioni oculari".

LLOQ: limite inferiore di quantificazione.

LogP: logaritmo del coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua.

Miscela: la miscela o soluzione composta di due o più sostanze.

Sostanza monocostituente: la sostanza, definita in base alla sua composizione quantitativa, in cui un costituente principale è presente in percentuale pari ad almeno l'80 % (p/p).

Sostanza multicostituente: la sostanza, definita in base alla sua composizione quantitativa, in cui più di un costituente principale è presente in concentrazione ≥ 10 % (p/p) e < 80 % (p/p). La sostanza multicostituente è il risultato di un processo di fabbricazione. La differenza tra miscela e sostanza multicostituente risiede nel fatto che la miscela è ricavata mischiando due o più sostanze senza che avvenga una reazione chimica, mentre la sostanza multicostituente è il risultato di una reazione chimica.

MTT: bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ile)-2,5-difeniltetrazolio; tiazolil blu tetrazolio bromuro.

Controllo negativo: campione contenente tutti i componenti di un sistema di prova, trattato con una sostanza che notoriamente induce una risposta positiva nel sistema di prova. Il campione subisce il medesimo procedimento dei campioni trattati con la sostanza chimica in esame e degli altri campioni di controllo ed è utilizzato per determinare la vitalità dei tessuti al 100 %.

Non classificata: sostanza chimica non classificata in termini di irritazione oculare (categoria GHS dell'ONU/CLP 2, categoria GHS dell'ONU 2A o 2B) o gravi lesioni oculari (categoria GHS dell'ONU/CLP 1). Termine intercambiabile con "Senza categoria GHS dell'ONU".

NSC_{killed}: colore non specifico nei tessuti morti.

NSC_{living}: colore non specifico nei tessuti vivi.

NSMTT: riduzione non specifica di MTT.

OD: densità ottica.

Standard di prestazione: standard basati su un metodo di riferimento validato e riconosciuto come scientificamente valido, che consentono di valutare la comparabilità di un metodo proposto simile sotto il profilo strutturale e funzionale. Detti standard comprendono: i) i componenti essenziali del metodo di prova; ii) un elenco minimo di sostanze di riferimento scelte tra le sostanze utilizzate per dimostrare l'accettabilità delle prestazioni del metodo di riferimento validato; e iii) in funzione dei risultati ottenuti con il metodo di riferimento validato, i livelli comparabili di accuratezza e affidabilità che il metodo proposto dovrebbe ottenere quando viene valutato utilizzando l'elenco minimo di sostanze di riferimento (18).

Controllo positivo: campione contenente tutti i componenti di un sistema di prova, trattato con una sostanza che notoriamente induce una risposta positiva nel sistema di prova. Il campione subisce il medesimo procedimento dei campioni trattati con la sostanza chimica in esame e degli altri campioni di controllo. Per poter valutare la variabilità nel tempo della risposta dei controlli positivi, l'entità della risposta positiva non deve essere eccessiva.

Pertinenza: descrizione del rapporto tra la prova e l'effetto studiato; indica se la prova è significativa e utile per uno scopo specifico. È il grado con cui la prova misura o prevede correttamente l'effetto biologico di interesse. La pertinenza comprende una valutazione dell'accuratezza (concordanza) di una prova (18).

Affidabilità: la misura in cui il metodo di prova può essere riprodotto nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi utilizzando il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità interna al laboratorio e la ripetibilità fra i laboratori (18).

Prova di sostituzione: una prova progettata per sostituire un metodo di prova applicato correntemente e accettato per l'individuazione dei pericoli e/o la valutazione dei rischi, e che è stata determinata per fornire una protezione equivalente o maggiore della salute dell'uomo o degli animali oppure dell'ambiente, se del caso, rispetto alla prova accettata, per tutte le possibili situazioni sperimentali e le sostanze di prova (18).

Riproducibilità: concordanza dei risultati ottenuti dall'esecuzione di prove ripetute sulla stessa sostanza chimica in esame in applicazione dello stesso protocollo sperimentale (cfr. Affidabilità) (18).

Effetti reversibili sugli occhi: cfr. "Irritazione oculare".

RhCE: (*Reconstructed human Cornea-like Epithelium*) modello di epitelio corneale umano ricostituito.

Batteria di prove: una batteria di prove consiste nel testare una o più sostanze chimiche in esame simultaneamente a un controllo negativo e a un controllo positivo.

SD: deviazione standard.

Sensibilità: percentuale di tutte le sostanze chimiche positive/attive correttamente classificate dalla prova. Misura l'accuratezza del metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza del metodo di prova (18).

Gravi lesioni oculari: la produzione di danni ai tessuti oculari o indebolimento grave della vista in seguito all'applicazione della sostanza chimica in esame sulla parte anteriore dell'occhio, non completamente reversibile entro 21 giorni dall'applicazione. Sinonimo di "effetti irreversibili sugli occhi" e di "categoria 1 del GHS dell'ONU/CLP".

Procedure operative standard: Procedure scritte formali che descrivono in dettaglio le modalità di esecuzione in laboratorio di specifiche operazioni di routine e nel quadro di una specifica prova. Rientrano nelle buone pratiche di laboratorio.

Specificità: percentuale di tutte le sostanze chimiche negative/inattive correttamente classificate dalla prova. Misura l'accuratezza del metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza del metodo (18).

Sostanza: un elemento chimico e i suoi composti, allo stato naturale od ottenuti per mezzo di un procedimento di produzione, compresi gli additivi necessari a mantenerne la stabilità e le impurezze derivanti dal procedimento utilizzato, ma esclusi i solventi che possono essere separati senza compromettere la stabilità della sostanza o modificarne la composizione.

Prova: Una singola sostanza chimica in esame sottoposta a prova in parallelo in almeno due repliche tessutali, come definito nella corrispondente procedura operativa standard.

Vitalità tessutale: parametro che misura l'attività totale di una popolazione di cellule in un tessuto ricostituito in termini della loro capacità di ridurre il colorante vitale MTT), che, in funzione del parametro misurato e del tipo di disegno sperimentale utilizzato, corrisponde al numero totale e/o alla vitalità delle cellule vive.

Approccio "dall'alto": approccio graduale applicato nel caso di una sostanza chimica in esame sospettata di causare gravi lesioni oculari, che inizia con la determinazione delle sostanze chimiche che inducono gravi lesioni oculari (esito positivo) rispetto ad altre sostanze chimiche (esito negativo).

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata applicando il presente metodo di prova.

Strategia di prova in sequenza: strategia sperimentale in tappe progressive, che applica i metodi sperimentali in maniera sequenziale; tutte le informazioni disponibili sulla sostanza chimica in esame sono vagliate in ciascuna fase, seguendo un approccio basato sul peso dell'evidenza, al fine di stabilire se vi sono informazioni sufficienti per prendere una decisione di classificazione del pericolo, prima di procedere alla fase successiva della strategia sperimentale. Se è possibile assegnare il potenziale di pericolo/la potenza della sostanza chimica in esame in base alle informazioni disponibili ad una determinata fase, non è necessario svolgere altre prove (18).

ULOQ: limite superiore di quantificazione.

Sistema mondiale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (GHS dell'ONU): sistema di classificazione delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) secondo tipi e livelli standardizzati di rischio fisico, sanitario e ambientale, che elabora i relativi elementi di comunicazione, quali pittogrammi, avvertenze, indicazioni di pericolo, consigli di prudenza e schede informative di sicurezza, per trasmettere informazioni sugli effetti avversi di dette sostanze a tutela delle persone (compresi datori di lavoro, lavoratori, trasportatori, consumatori e personale di pronto intervento) e dell'ambiente (1).

Categoria 1 del GHS dell'ONU/CLP: cfr. "Gravi lesioni oculari".

Categoria 2 del GHS dell'ONU/CLP: cfr. "Irritazione oculare".

Senza categoria del GHS dell'ONU/CLP: sostanza chimica che non rientra nella categoria 1 o 2 del GHS dell'ONU/CLP (o categoria 2A o 2B del GHS dell'ONU). Sostituibile con "Non classificata".

UPLC: cromatografia liquida a ultra alta prestazione.

UVCB (*Substance of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products or Biological Materials*): sostanze di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali biologici.

Metodo di prova valido: metodo di prova la cui pertinenza e affidabilità sono ritenute soddisfacenti per uno scopo specifico e che si fonda su principi scientificamente provati. Un metodo di prova non è mai valido in termini assoluti ma soltanto in relazione a un obiettivo definito (18).

Metodo di prova validato: metodo di prova in base al quale sono stati completati studi di validazione per determinare la pertinenza (compresa l'accuratezza) e l'affidabilità per un fine specifico. Va sottolineato che un metodo di prova validato potrebbe non avere un rendimento sufficiente in termini di valori di accuratezza e affidabilità ritenuti accettabili per il raggiungimento dell'obiettivo prefissato (18).

VRM: Metodo di riferimento validato.

VRM1: Con VRM1 (Metodo di riferimento validato 1) si intende il metodo EpiOcular™ EIT.

VRM2: Con VRM2 (Metodo di riferimento validato 2) si intende il metodo SkinEthic™ HCE EIT.

Peso dell'evidenza: processo che consiste nel tener conto dei punti di forza e di debolezza di informazioni diverse per conseguire e supportare una data conclusione relativa al potenziale di pericolo di una sostanza chimica in esame.

Appendice 2

Principali Componenti dei Metodi di Prova su Rhce Validati ai Fini dell'Identificazione Delle Sostanze Chimiche che non Richiedono Classificazione né Etichettatura per Irritazione Oculare o Gravi Lesioni Oculari

Componenti della prova	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Protocolli	Liquidi (pipettabile a ≤ 37 ± 1 °C per 15 minuti)	Solidi (non pipettabile)	Liquidi e viscosi (pipettabile)	Solidi (non pipettabile)
Superficie del modello	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Numero di repliche tessutali	Almeno 2	Almeno 2	Almeno 2	Almeno 2
Verifica preventiva di interferenze colore	50 µl + 1 ml H_2O per 60 min a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % UR (sostanze chimiche in esame non colorate), o 50 µl + 2 ml di isopropanolo mescolato per 2-3 ore a T ambiente (sostanze chimiche in esame colorate) → Se la densità ottica della sostanza chimica in esame a 570 ± 20 nm, dopo sottrazione della OD per l'isopropanolo o acqua è > 0,08 (corrispondente a circa il 5 % della OD media del controllo negativo), devono essere eseguiti adeguati controlli su organismi viventi.	50 mg + 1 ml H_2O per 60 min a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % UR (sostanze chimiche in esame non colorate) e/o 50 mg + 2 ml di isopropanolo mescolato per 2-3 ore a T ambiente (sostanze chimiche in esame colorate e non colorate) → Se la densità ottica della sostanza chimica in esame a 570 ± 20 nm, dopo sottrazione della OD per l'isopropanolo o acqua è > 0,08 (corrispondente a circa il 5 % della OD media del controllo negativo), devono essere eseguiti adeguati controlli su organismi viventi.	10 µl + 90 µl H_2O mescolati per 30 ± 2 min a T ambiente (TA, 18-28 °C) → se la sostanza chimica in esame è colorata, devono essere eseguiti adeguati controlli su organismi viventi.	10 mg + 90 µl H_2O mescolati per 30 ± 2 min a T ambiente → se la sostanza chimica in esame è colorata, devono essere eseguiti adeguati controlli su organismi viventi.

Componenti della prova	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Verifica preventiva di riduzione diretta dell'MTT	50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml di soluzione per 180 ± 15 min a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % UR → Se la soluzione vira al blu/viola, devono essere eseguiti adeguati controlli su tessuti uccisi per congelamento (come controllo negativo si usa 50 µl di acqua distillata sterile in una soluzione MTT)	50 mg + 1 ml di soluzione MTT 1 mg/ml per 180 ± 15 min a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % UR → Se la soluzione vira al blu/viola, devono essere eseguiti adeguati controlli su tessuti uccisi per congelamento (come controllo negativo si usa 50 µl di acqua distillata sterile in una soluzione MTT)	30 µl + 300 µl di soluzione MTT 1 mg/ml per 180 ± 15 min a 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % UR → Se la soluzione vira al blu/viola, devono essere eseguiti adeguati controlli su tessuti uccisi in acqua (come controllo negativo si usa 30 µl di acqua distillata sterile in una soluzione MTT)	30 mg + 300 µl MTT di soluzione MTT 1 mg/ml per 180 ± 15 min a 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % UR → Se la soluzione vira al blu/viola, devono essere eseguiti adeguati controlli su tessuti uccisi in acqua (come controllo negativo si usa 30 µl di acqua distillata sterile in una soluzione MTT)
Pretrattamento	20 µl di DPBS privo di Ca^{2+}/Mg^{2+} per 30 ± 2 min a 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % UR, al riparo dalla luce.	20 µl di DPBS privo di Ca^{2+}/Mg^{2+} per 30 ± 2 min a 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % UR, al riparo dalla luce.	-	-
Dosi e trattamento	50 µl (83.3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2), misurati con strumenti calibrati (ad es. un cucchiaio raso è calibrato per contenere 50 mg di cloruro di sodio).	10 µl di DPBS privo di Ca^{2+}/Mg^{2+} + 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) Per sostanze viscose, usare maglie di nylon	30 µl di DPBS privo di Ca^{2+}/Mg^{2+} + 30 ± 2 mg (60 mg/cm^2)
Tempo e temperatura di esposizione	30 min (± 2 min) nel mezzo di coltura a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % UR	6 ore (± 0,25 h) nel mezzo di coltura a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % UR	30 min (± 2 min) nel mezzo di coltura a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % UR	4 ore (± 0,1 h) nel mezzo di coltura a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % UR

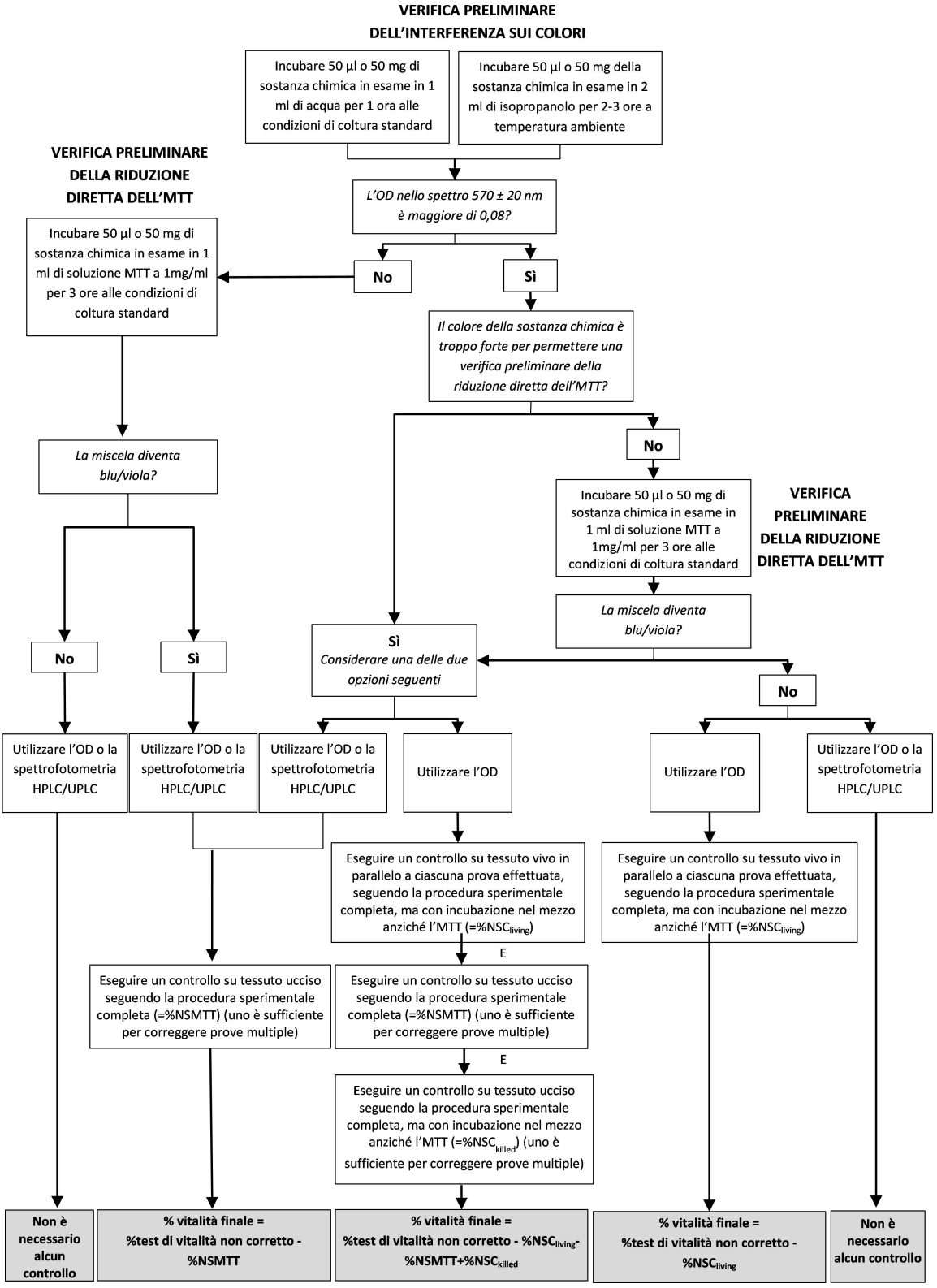
Componenti della prova	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Risciacquo a temperatura ambiente	3 volte in 100 ml di DPBS privo di Ca^{2+}/Mg^{2+}	3 volte in 100 ml di DPBS privo di Ca^{2+}/Mg^{2+}	20 ml di DPBS privo di Ca^{2+}/Mg^{2+}	25 ml di DPBS privo di Ca^{2+}/Mg^{2+}
Immersione post-esposizione	12 min (± 2 min) a T amb. nel mezzo di coltura	25 min (± 2 min) a T amb. nel mezzo di coltura	30 min (± 2 min) a 37°C, 5 % CO_2, 95 % UR nel mezzo di coltura	30 min (± 2 min) a T amb. nel mezzo di coltura
Incubazione post-esposizione	120 min (± 15 min) nel mezzo di coltura a 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % UR	18 h (± 0,25 h) nel mezzo di coltura a 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % UR	nessuna	18 h (± 0,5 h) nel mezzo di coltura a 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % UR
Controllo negativo	50 µl H_2O Testato in parallelo	50 µl H_2O Testato in parallelo	30 + 2µl di DPBS privo di Ca^{2+}/Mg^{2+} Testato in parallelo	30 + 2µl di DPBS privo di Ca^{2+}/Mg^{2+} Testato in parallelo
Controllo positivo	50 µl di acetato di metile Testato in parallelo	50 µl di acetato di metile Testato in parallelo	30 + 2µl di acetato di metile Testato in parallelo	30 + 2µl di acetato di metile Testato in parallelo

Componenti della prova	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Soluzione di MTT	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Tempo e temperatura dell'incubazione di MTT	180 min (± 15 min) a 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % UR	180 min (± 15 min) a 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % UR	180 min (± 15 min) a 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % UR	180 min (± 15 min) a 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % UR
Solvente di estrazione	2 ml di isopropanolo (estratto della parte superiore e inferiore dell'inserto bucando il tessuto)	2 ml di isopropanolo (estratto della parte superiore dell'inserto bucando il tessuto)	1,5 ml di isopropanolo (estratto della parte superiore e inferiore dell'inserto)	1,5 ml di isopropanolo (estratto della parte superiore dell'inserto)
Tempo e temperatura di estrazione	2-3 ore agitando (~120 giri/min.) a T amb. o per una notte a 4-10 °C	2-3 ore agitando (~120 giri/min.) a T amb. o per una notte a 4-10 °C	4 ore agitando (~120 giri/min.) a T amb. o almeno per una notte senza agitare a 4-10 °C	Almeno 2 h agitando (~120 giri/min.) a T amb.
Lettura della densità ottica	570 nm (550 - 590 nm) senza filtro di riferimento	570 nm (550-590 nm) senza filtro di riferimento	570 nm (540 - 600 nm) senza filtro di riferimento	570 nm (540 - 600 nm) senza filtro di riferimento
Controllo di qualità dei tessuti	Trattamento con 100 µl di Triton X-100 allo 0,3 % (v/v) 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Trattamento con 100 µl di Triton X-100 allo 0,3 % (v/v) 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Trattamento di 30 min con SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	Trattamento di 30 min con SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

Componenti della prova	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Criteri di accettabilità	1. La OD media delle repliche tessutali trattate con il controllo negativo deve essere > 0,8 e < 2,5 2. La vitalità media delle repliche tessutali esposte per 30 minuti con il controllo positivo, espresso in % del controllo negativo, deve essere < 50 % 3. La differenza della vitalità tra due repliche tessutali non deve superare il 20 %.	1. La OD media delle repliche tessutali trattate con il controllo negativo deve essere > 0,8 e < 2,5 2. La vitalità media delle repliche tessutali esposte per 6 ore con il controllo positivo, espresso in % del controllo negativo, deve essere < 50 % 3. La differenza della vitalità tra due repliche tessutali non deve superare il 20 %.	1. La OD media delle repliche dei tessuti trattate con il controllo negativo deve essere > 1,0 e < 2,5 2. La vitalità media delle repliche tessutali esposte per 30 minuti con il controllo positivo, espresso in % del controllo negativo, deve essere ≤ 30 % 3. La differenza della vitalità tra due repliche tessutali non deve superare il 20 %.	1. La OD media delle repliche dei tessuti trattate con il controllo negativo deve essere > 1,0 e < 2,5 2. La vitalità media delle repliche tessutali esposte per 4 ore con il controllo positivo, espresso in % del controllo negativo, deve essere ≤ 20 % 3. La differenza della vitalità tra due repliche tessutali non deve superare il 20 %.

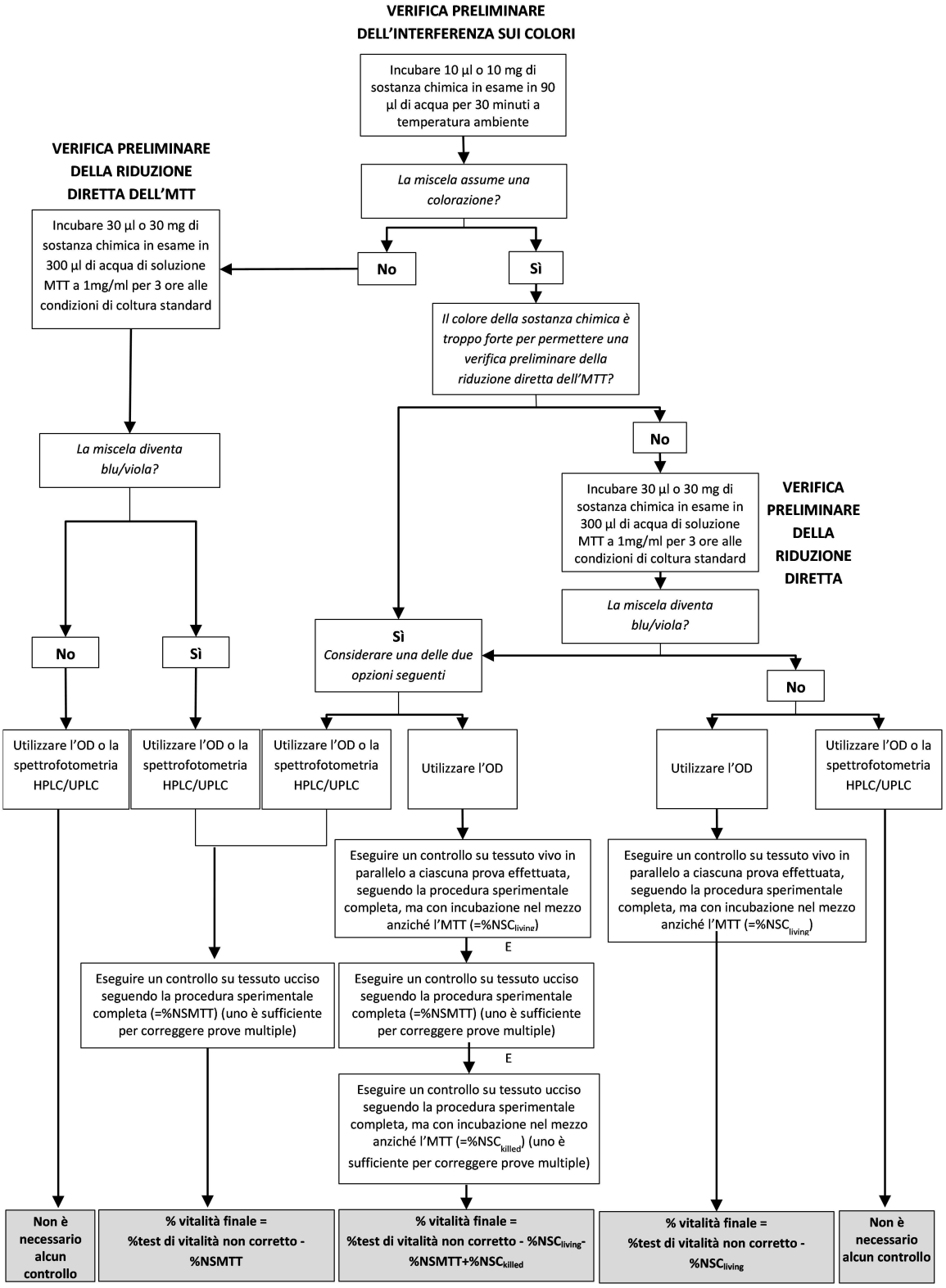
Appendice 3

DIAGRAMMA DI FLUSSO ILLUSTRATIVO E ORIENTATIVO DELLA PROCEDURA PER IDENTIFICARE E TRATTARE LE SOSTANZE CHIMICHE IN ESAME RIDUTTRICI DIRETTE DELL'MTT E/O CHE PROVOCANO UN'INTERFERENZA DI COLORI, SULLA BASE DELLA PROCEDURA OPERATIVA STANDARD DEL VRM1



Appendice 4

DIAGRAMMA DI FLUSSO ILLUSTRATIVO E ORIENTATIVO DELLA PROCEDURA PER IDENTIFICARE E TRATTARE LE SOSTANZE CHIMICHE IN ESAME RIDUTTRICI DIRETTE DELL'MTT E/O CHE PROVOCANO UN'INTERFERENZA DI COLORI, SULLA BASE DELLA PROCEDURA OPERATIVA STANDARD DEL VRM2



Appendice 5

PRINCIPALI PARAMETRI E CRITERI DI ACCETTAZIONE DELLA PROVA DI EFFICACIA DI UN SISTEMA DI SPETTROMETRIA HPLC/CLUP PER LA MISURAZIONE DI UN ESTRATTO DI MTT FORMAZAN ESTRATTO DA COSTRUTTI TESSUALI DI RHCE

Parametro	Protocollo derivato dagli orientamenti della FDA (36)(38)	Criteri di accettabilità
Selettività	Analisi dell'isopropanolo, del bianco vivente (estratto dal costrutto tessutale di RhCE vivente senza trattamento in isopropanolo), bianco ucciso (estratto dal costrutto tessutale di RhCE ucciso senza trattamento in isopropanolo) e di un colorante (blu di metilene, ad esempio)	$Area_{interferenza} \leq 20\ \%$ della $Area_{LLOQ}$ [1]
Precisione	Controlli della qualità (ossia, MTT formazan a 1,6 µg/ml, 16 µg/ml e 160 µg/ml) in isopropanolo (n=5)	CV ≤ 15 % o ≤ 20 % per il LLOQ
Accuratezza	Controlli della qualità in isopropanolo (n=5)	% scarto ≤ 15 % o ≤ 20 % per il LLOQ
Effetto matrice	Controlli della qualità nel bianco vivente (n=5)	85 % ≤ % effetto matrice ≤ 115 %
Effetto residuo	Analisi dell'isopropanolo dopo un ULOQ [2] standard	$Area_{interferenza} \leq 20\ \%$ della $Area_{LLOQ}$
Riproducibilità (nello stesso giorno)	3 curve di calibrazione indipendenti (sulla base di 6 consecutive diluizioni di 1/3 del MTT formazan in isopropanolo, a partire da ULSQ, cioè 200 µg/ml); Controlli della qualità in isopropanolo (n=5)	Curve di calibrazione: % scarto ≤ 15 % o ≤ 20 % per il LLOQ Controlli della qualità: % scarto ≤ 15 % e CV ≤ 15 %
Riproducibilità (in giorni diversi)	Giorno 1: 1 curva di taratura e controlli della qualità in isopropanolo (n = 3) Giorno 2: 1 curva di taratura e controlli della qualità in isopropanolo (n = 3) Giorno 3: 1 curva di taratura e controlli della qualità in isopropanolo (n = 3)	
Stabilità a breve termine di MTT formazan in un estratto tessutale di RHCE	Controlli della qualità nel bianco vivente (n = 3) analizzato il giorno della preparazione, dopo conservazione per 24 ore a temperatura ambiente	% scarto ≤ 15 %
Stabilità a lungo termine dell'MTT formazan in un estratto tessutale di RHCE, se necessario	Controlli della qualità nel bianco vivente (n = 3) analizzato il giorno della preparazione, dopo diversi giorni di conservazione a -20 °C	% scarto ≤ 15 %

[1] LLOQ: limite inferiore di quantificazione, definito come corrispondente a una vitalità tessutale di 1-2 %, ossia 0,8 µg/ml.
[2] ULOQ: limite superiore di quantificazione, definito come corrispondente almeno a due volte la concentrazione massima prevista di MTT formazan in estratti di isopropanolo da controlli negativi (~ 70 µg/ml in base al VRM), cioè 200 µg/ml.

B.70 SAGGIO *IN VITRO* CHE UTILIZZA IL RECETTORE ESTROGENICO RICOMBINANTE UMANO (hrER) PER INDIVIDUARE LE SOSTANZE CHIMICHE CHE PRESENTANO UN'AFFINITÀ DI LEGAME CON I RECETTORI DI ESTROGENI

INTRODUZIONE GENERALE

Linea guida dell'OCSE per i metodi di prova basata su standard di prestazione

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida n. 493 (2015) dell'OCSE. La linea guida n. 493 è basata su standard di prestazione (*performance-based test guideline* - PBTG) che descrive la metodologia applicabile ai metodi di prova *in vitro* che si avvalgono del recettore estrogenico ricombinante umano per individuare le sostanze che presentano affinità di legame con i recettori di estrogeni (prove di legame all'hrER). Comprende due metodi di prova strutturalmente e funzionalmente simili volti ad individuare i ligandi dei recettori di estrogeni (ERα) e mira a facilitare l'elaborazione di nuovi metodi di prova simili o modificati, conformemente ai principi di validazione illustrati nel documento di orientamento dell'OCSE *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment* (1). La presente PBTG si basa sui seguenti protocolli di riferimento (cfr. l'appendice 2 e appendice 3) completamente validati:

— il saggio di Freyberg-Wilson (FW): metodo di prova *in vitro* di legame ai recettori di estrogeni (ER) che utilizza un ERα ricombinante umano a lunghezza intera (2); e

— il saggio del CERI (*Chemical Evaluation and Research Institute*): metodo di prova *in vitro* di legame ai recettori di estrogeni (ER) che utilizza la proteina che costituisce il dominio di legame del ligando di un ER ricombinante umano (2).

Sono disponibili standard di prestazione (PS) (3) per facilitare l'elaborazione e la validazione di metodi di prova simili finalizzati al medesimo endpoint di sicurezza e per consentire di aggiornare tempestivamente la PBTG 493 integrandola con nuovi protocolli simili. Ciò può avvenire, tuttavia, solo dopo che l'OCSE abbia esaminato e approvato tali nuovi protocolli, dichiarando che rispettano gli standard di prestazione. Qualsiasi metodo di prova incluso nella linea guida TG 493 può essere scelto e applicato ai fini della conformità con i requisiti nazionali in materia di prove di legame ai recettori estrogenici nel quadro del sistema dell'OCSE di reciproca accettazione dei dati.

Contesto e principi relativi ai metodi di prova inclusi nella presente linea guida

2. Nel 1998 l'OCSE ha avviato lavori a carattere altamente prioritario destinati a rivedere le linee guida esistenti, e a elaborarne di nuove, per lo screening e la sperimentazione relativi alle sostanze chimiche ritenute potenziali interferenti endocrini. Nel 2012 è stato rivisto il quadro concettuale dell'OCSE per la sperimentazione e la valutazione delle sostanze chimiche potenzialmente capaci di alterare il sistema endocrino. Le versioni originali e riviste del quadro concettuale figurano come allegati nel documento *Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption* (4). Il quadro concettuale comprende cinque livelli, ciascuno dei quali corrisponde a un diverso livello di complessità biologica. Le prove di legame agli ER descritte nel presente metodo di prova sono di livello 2, che comprende «*saggi in vitro che forniscono dati su determinati meccanismi/vie di attivazione endocrina*». Il presente metodo di prova si applica alle prove *in vitro* di legame ai recettori concepite per individuare i ligandi del recettore estrogenico alfa umano (ERα).

3. La pertinenza delle prove *in vitro* di legame agli ER sotto il profilo delle funzioni biologiche è stata chiaramente dimostrata. Le prove di legame agli ER sono concepite per individuare le sostanze chimiche potenzialmente capaci di interferire con i meccanismi d'azione dell'ormone estrogeno, e sono state ampiamente utilizzate nel corso degli ultimi due decenni per caratterizzare la distribuzione tessutale degli ER e per individuare gli agonisti/antagonisti degli ER. Queste prove si basano sull'interazione ligando-recettore, che costituisce la fase iniziale del percorso di segnalazione degli estrogeni, essenziale per la funzione riproduttiva in tutti i vertebrati.

4. L'interazione degli estrogeni con gli ER può influenzare la trascrizione dei geni controllati dagli estrogeni e indurre effetti non genomici, che possono portare all'induzione o all'inibizione di processi cellulari, compresi quelli necessari alla proliferazione cellulare, allo sviluppo fetale normale e alla funzione riproduttiva (5) (6) (7). La perturbazione dei sistemi estrogenici normali può potenzialmente indurre effetti negativi sul normale sviluppo (ontogenesi), sulla salute riproduttiva e sull'integrità del sistema riproduttivo. Una errata segnalazione degli ER può comportare, ad esempio, un maggiore rischio di cancro ormonedipendente, una ridotta fertilità e alterazioni della crescita e dello sviluppo del feto (8).

5. Le prove di legame *in vitro* sono basate sull'interazione diretta tra una sostanza e il sito specifico di legame recettore-ligando che regola la trascrizione genica. La prova di legame al recettore estrogenico alfa ricombinante umano (hrERα) consiste principalmente nel misurare la capacità di un ligando radiomarcato ([^{3}H]-17β-estradiolo) di legarsi agli ER in presenza di concentrazioni crescenti di una sostanza chimica in esame (denominata «competitore»). Le sostanze chimiche in esame che presentano un'alta affinità di legame agli ER competono con il ligando radiomarcato a una concentrazione inferiore rispetto alle sostanze chimiche che hanno una più debole affinità per il recettore. Il presente metodo di prova consta di due componenti principali: una prova di legame a saturazione per caratterizzare i parametri di interazione recettore-ligando e documentare la specificità dei legami agli ER, seguita da una prova di legame competitivo per determinare in che misura una sostanza chimica in esame compete con un ligando radiomarcato per legarsi agli ER.

6. Gli studi di validazione dei saggi di legame del CERI e di FW hanno dimostrato la loro pertinenza e affidabilità per i fini previsti (2).

7. Le definizioni e le abbreviazioni utilizzate nel presente metodo di prova figurano nell'appendice 1.

Portata e limiti delle prove di legame ai recettori

8. I presenti metodi di prova sono proposti a fini di screening e di definizione delle priorità, ma possono fornire anche informazioni sull'evento molecolare scatenante (MIE), utile nel quadro di un approccio basato sulla forza probante dei dati. Essi studiano il legame chimico con il dominio di legame di un ligando all'ERα in un sistema *in vitro*. Pertanto non è opportuno che i risultati siano direttamente estrapolati e trasposti ai complessi meccanismi di segnalazione e regolazione che caratterizzano un sistema endocrino intatto *in vivo*.

9. Il legame del ligando naturale 17β-estradiolo agli ER è la prima fase di una serie di eventi molecolari che attiva la trascrizione di geni bersaglio e, in ultima analisi, determina un cambiamento fisiologico (9). Pertanto il legame al dominio di legame del ligando all'ERα è considerato uno dei meccanismi chiave di perturbazione endocrina mediata dagli ER, benché esistano altri meccanismi capaci di indurre una perturbazione endocrina, tra i quali: i) le interazioni con i siti dell'ERα diversi dai siti di legame del ligando, ii) le interazioni con altri recettori pertinenti per la segnalazione estrogenica, gli ERβ e gli ER accoppiati alla proteina G ed altri recettori e sistemi enzimatici del sistema endocrino; iii) la sintesi ormonale; iv) l'attivazione metabolica e/o l'inattivazione ormonale; v) la distribuzione di ormoni nei tessuti bersaglio; e vi) l'eliminazione degli ormoni dall'organismo. Nessuna delle prove oggetto del presente metodo di prova tratta i descritti meccanismi di azione.

10. Il presente metodo di prova studia la capacità delle sostanze di legarsi all'ERα umano e non distingue tra agonisti o antagonisti dell'ERα. Il metodo di prova non riguarda nemmeno gli eventi che avvengono più a valle, quali la trascrizione genica o i cambiamenti fisiologici. Considerando che durante la validazione sono state utilizzate solo singole sostanze monocostituente, non esistono risultati utili ai fini dell'applicabilità alle miscele. Cionondimeno, il metodo di prova è teoricamente applicabile alle prove sulle sostanze multicostituente e sulle miscele. Prima di applicare il presente metodo di prova a una miscela per generare dati ai fini regolamentari previsti, si deve considerare se, e in caso affermativo, perché, esso possa fornire risultati adeguati a tale scopo. Tali considerazioni non sono necessarie in presenza di un obbligo normativo di prova sulla miscela.

11. I sistemi recettoriali *cell-free* non hanno alcuna capacità metabolica intrinseca e non sono stati validati in combinazione con sistemi enzimatici metabolici. Tuttavia, potrebbe essere possibile incorporare l'attività metabolica nella progettazione dello studio, a condizione che siano effettuati ulteriori lavori di validazione.

12. Le sostanze chimiche capaci di indurre la denaturazione della proteina (ossia la proteina che costituisce il recettore), come i tensioattivi o le sostanze chimiche che possono modificare il pH della soluzione tampone, non possono essere sottoposte alla prova oppure possono essere testate solo alle concentrazioni alle quali non si verificano tali interazioni. Negli altri casi, l'intervallo delle concentrazioni di prova di una sostanza chimica è limitato dalla sua solubilità nella soluzione tampone della prova.

13. A fini di informazione, la tabella 1 fornisce i risultati delle prove relative alle 24 sostanze testate con i due metodi di prova pienamente validati descritti nella presente linea guida. Di queste sostanze, 17 sono classificate come ligandi degli ER e 6 come non ligandi sulla base di relazioni pubblicate, segnatamente le prove *in vitro* per l'attivazione trascrizionale e/o la prova uterotrofica (9) (10) (11) (13) (14) (15). Con riferimento ai dati sintetizzati nella tabella 1, i due metodi di prova sono giunti ad una conclusione quasi identica circa la classificazione di tutte le sostanze fino a 10^{-4} M, e ciascuna sostanza è stata correttamente classificata come ligando o non ligando degli ER. Ulteriori informazioni su questo gruppo di sostanze nonché sulle sostanze aggiuntive testate nelle prove di legame agli ER durante gli studi di validazione sono fornite negli standard di prestazione per la prova di legame agli hrER (3) nell'appendice 2 (tabelle 1, 2 e 3).

Tabella 1

Classificazione delle sostanze come ligandi o non ligandi degli ER in esito alle prove di legame agli hrER in base ai metodi FW e CERI, e confronto con la risposta prevista

	Nome della sostanza	Numero CAS	Risposta prevista	Saggio di FW		Saggio del CERI		Classe chimica nel sistema MeSH	Classe di prodotto
				Intervallo di concentrazione (M)	Classificazione	Intervallo di concentrazione (M)	Classificazione		
1	17β-estradiolo	50-28-2	*Ligando*	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Ligando	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Ligando	Steroide	Prodotto farmaceutico e veterinario
2	Noretinodrel	68-23-5	*Ligando*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Ligando	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Ligando	Steroide	Prodotto farmaceutico e veterinario
3	Noretindrone	68-22-4	*Ligando*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Ligando	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Ligando	Steroide	Prodotto farmaceutico e veterinario
4	Di-*n*-butilftalato	84-74-2	*Non ligando* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Non-ligando (**) ()	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Non-ligando (**) ()	Idrocarburo (ciclico), estere	Plasticizzante, intermediario chimico
5	DES	56-53-1	*Ligando*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	Idrocarburo (ciclico), fenolo	Prodotto farmaceutico e veterinario
6	17α-etinilestradiolo	57-63-6	*Ligando*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	Steroide	Prodotto farmaceutico e veterinario
7	Meso-esestrolo	84-16-2	*Ligando*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	Idrocarburo (ciclico), fenolo	Prodotto farmaceutico e veterinario
8	Genisteina	446-72-0	*Ligando*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	Idrocarburo (eterociclico), flavonoide	Prodotto naturale
9	Equol	531-95-3	*Ligando*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	Fitoestrogeni Metabolite	Prodotto naturale
10	Parabene (*n*-butil-4-idrossibenzoato) di butile	94-26-8	*Ligando*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	Parabene	Conservante

	Nome della sostanza	Numero CAS	Risposta prevista	Saggio di FW		Saggio del CERI		Classe chimica nel sistema MeSH	Classe di prodotto
				Intervallo di concentrazione (M)	Classificazione	Intervallo di concentrazione (M)	Classificazione		
11	Nonilfenolo (miscela)	84852-15-3	*Ligando*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	Alchilfenolo	Composto intermedio
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*Ligando*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	Organoclorurato	Insetticida
13	Corticosterone	50-22-6	*Non ligando* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Non ligando	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Non-ligando	Steroide	Prodotto naturale
14	Zearalenone	17924-92-4	*Ligando*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	Idrocarburo (eterociclico), lattone	Prodotto naturale
15	Tamoxifen	10540-29-1	*Ligando*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	Idrocarburo (ciclico)	Prodotto farmaceutico e veterinario
16	5α-diidrotestosterone	521-18-6	*Ligando*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	Steroide, non fenolico	Prodotto naturale
17	Bisfenolo A	80-05-7	*Ligando*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	Fenolo	Intermediario chimico
18	4-*n*-eptilfenolo	1987-50-4	*Ligando*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ambiguo [a]	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	Alchilfenolo	Intermediario
19	Kepone (Clordecone)	143-50-0	*Ligando*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	Idrocarburo (alogenato)	Pesticida
20	Benzo(a)antracene	56-55-3	*Non-ligando*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Non-ligando [b]	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Non-ligando [b]	Idrocarburo aromatico	Intermediario
21	Enterolattone	78473-71-9	*Ligando*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligando	Fitoestrogeno	Prodotto naturale
22	Progesterone	57-83-0	*Non ligando* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Non-ligando	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Non-ligando	Steroide	Prodotto naturale

	Nome della sostanza	Numero CAS	Risposta prevista	Saggio di FW		Saggio del CERI		Classe chimica nel sistema MeSH	Classe di prodotto
				Intervallo di concentrazione (M)	Classificazione	Intervallo di concentrazione (M)	Classificazione		
23	Ottiltrietossisilano	2943-75-1	*Non ligando*	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	Non-ligando	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	Non-ligando	Silano	Modificatore di superficie
24	Atrazina	1912-24-9	*Non ligando* (*)	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-4}$	Non-ligando	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-4}$	Non-ligando	Composto eterociclico	Erbicida

(*) Limite di solubilità < 1×10^{-4} M.

(**) L'uso e la classificazione dello ftalato di-*n*-butile (DBP) come non ligando si basano su prove di concentrazione fino a 10^{-4} M, in quanto durante gli studi di pre-validazione alcuni laboratori avevano osservato che la sostanza era insolubile a 10^{-3} M (ad esempio, presentava torbidità).

(+) Durante lo studio di validazione, lo ftalato di-*n*-butile (DBP) è stato testato come sostanza in esame codificata a concentrazioni fino a 10^{-3} M. In queste condizioni, alcuni laboratori hanno osservato una diminuzione dei legami del ligando radiomarcato alla massima concentrazione (10^{-3} M) e/o un'approssimazione ambigua della curva. In queste batterie di prove, il DPB è stato classificato come «equivoco» o «ligando» in 3/5 laboratori che applicano il saggio del CERI e in 5/6 laboratori che applicano il saggio di FW (cfr. riferimento (2), sezioni IV.B.3a, b e VI.A).

(a) La classificazione ottenuta non è conforme alla classificazione prevista. La classificazione del 4-*n*-eptilfenolo come «equivoco» o «non ligando» da parte di 3/5 laboratori ha dato luogo a una classificazione media di «equivoco». Un'analisi più approfondita ha rivelato che ciò è dovuto a limiti di solubilità chimica che hanno impedito di generare una curva di legame completa.

(b) Durante lo studio di validazione, il benzo(a)antracene è stato riclassificato come non ligando (ossia negativo) in base a pubblicazioni che dimostrano che l'attività estrogenica *in vitro* segnalata per questa sostanza (16) dipende principalmente dalla sua attivazione metabolica(17)(18). Non si prevede attivazione metabolica enzimatica della sostanza nelle prove di legame agli hrER in sistemi *cell-free* come quelle utilizzate in questo studio di validazione inter-laboratori. Pertanto, la classificazione corretta per questa sostanza è «non ligando» se utilizzata nelle condizioni sperimentali previste dai saggi di FW e del CERI.

COMPONENTI DEL METODO DI PROVA DI LEGAME ALL'HRER

Componenti essenziali del metodo di prova

14. Il presente metodo di prova si applica alle prove che utilizzano un recettore estrogenico e un ligando di tale recettore che presenti un'affinità sufficientemente forte. Tale ligando può fungere da marcatore/tracciante della prova ed essere spiazzato dalla sostanza chimica in esame man mano che le concentrazioni aumentano. Le prove di legame comprendono i seguenti due componenti principali: 1) legame a saturazione; e 2) legame competitivo. La prova di legame a saturazione è utilizzata per confermare la specificità e l'attività delle preparazioni di recettori, mentre per valutare la capacità della sostanza chimica in esame di legarsi all'hrER si ricorre ad una prova di legame competitivo.

Controlli

15. Occorre spiegare in dettaglio il motivo della scelta della sostanza estrogenica di riferimento e delle sostanze di controllo concomitanti. I controlli concomitanti - che consistono, come opportuno, in un controllo con solvente (mezzo disperdente), un controllo positivo (ligando degli ER; affinità forte e debole), un controllo negativo (non ligando) - servono ad attestare il corretto funzionamento del metodo di prova nelle condizioni sperimentali e forniscono elementi di confronto tra esperimenti; essi rientrano generalmente tra i criteri di accettabilità di un determinato esperimento (1). Per ciascuna batteria di prove, una medesima piastra deve essere utilizzata per stabilire le curve di tutte le concentrazioni della sostanza estrogenica di riferimento e dei controlli (ossia, ligando debole e non ligando). Tutte le altre piastre devono contenere: 1) una concentrazione elevata (che spiazza quasi completamente il ligando radiomarcato) e una concentrazione media (corrispondente circa all'IC_{50}) di E2 e del ligando debole in triplicato; 2) controlli con solvente e ligandi non specifici, ciascuno in triplicato.

Procedure standard di controllo della qualità

16. Le procedure standard di controllo della qualità vanno applicate come descritto per ciascuna prova al fine di garantire che i recettori siano attivi, le concentrazioni chimiche siano corrette, l'intervallo di tolleranza rimanga stabile nel corso delle multiple replicazioni della prova e che la prova mantenga la capacità di fornire nel tempo le previste risposte relative ai legami agli ER.

Dimostrazione della competenza del laboratorio

17. Prima di testare sostanze chimiche sconosciute secondo il presente metodo di prova, ciascun laboratorio deve dimostrare la propria competenza nell'uso della prova effettuando prove di legame a saturazione per confermare la specificità e l'attività della preparazione dei recettori, nonché prove di legame competitivo con la sostanza estrogenica di riferimento e i controlli (ligando debole e non ligando). Ciascun laboratorio dovrebbe costituire una banca dati storica contenente i risultati ottenuti per la sostanza estrogenica di riferimento e i controlli in esito a 3-5 esperimenti indipendenti condotti in giorni diversi. Tali esperimenti costituiranno la base per la sostanza estrogenica di riferimento e i controlli storici del laboratorio e saranno utilizzati come valutazione parziale dell'accettabilità della prova per le batterie di prove future.

18. La reattività del sistema di prova sarà confermata anche testando le sostanze da utilizzare per stabilire la competenza del laboratorio elencate nella tabella 2. L'elenco delle sostanze da utilizzare per stabilire la competenza del laboratorio è un sottoinsieme delle sostanze di riferimento indicate negli standard di prestazione per le prove di legame agli ER (3). Tali sostanze sono disponibili sul mercato, rappresentano le classi di sostanze chimiche comunemente associate all'attività di legame agli ER, presentano un idoneo intervallo dell'attività biologica (*potency*) attesa per i ligandi agli ER (da forte a debole) oppure l'assenza di legame (ossia, negativi). Per ciascuna sostanza da utilizzare ai fini della competenza del laboratorio, le concentrazioni testate devono coprire gli intervalli di valori indicati nella tabella 2. Per ogni sostanza occorre eseguire almeno tre esperimenti e i risultati devono essere conformi alla prevista attività chimica. Ciascun esperimento va condotto in modo indipendente (ossia con nuove diluizioni del recettore, delle sostanze chimiche e del reagente), con tre repliche per ciascuna concentrazione. La competenza è dimostrata quando ciascuna sostanza testata ai fini della competenza è classificata correttamente (risposta positiva/negativa). La prova ai fini della competenza è effettuata da ciascun tecnico nell'ambito della formazione al presente metodo di prova.

Tabella 2

Elenco di controlli e di sostanze testate ai fini della competenza per i metodi di prova di legame competitivo all'hrER (1)

N.	Nome della sostanza	Numero CAS (2)	Risposta prevista (3) (4)	Intervallo delle concentrazioni di prova (M)	Classe chimica nel sistema MeSH (5)	Classe di prodotto (6)
	Controlli (sostanza estrogenica di riferimento, ligando debole, non ligando)					
1	17−εστραδιολο	50-28-2	Ligando	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Steroide	Prodotto farmaceutico e veterinario
2	Noretinodrel (o) Noretindrone	68-23-5 (o) 68-22-4	Ligando	3×10^{-9} – 30×10^{-6}	Steroide	Prodotto farmaceutico e veterinario
3	Ottiltrietossisilano	2943-75-1	Non ligando	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Silano	Modificatore di superficie
	Sostanze di prova ai fini di competenza (6)					
4	Dietilstilbestrolo	56-53-1	Ligando	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Idrocarburo (ciclico), fenolo	Prodotto farmaceutico e veterinario
5	17α-etinilestradiolo	57-63-6	Ligando	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Steroide	Prodotto farmaceutico e veterinario
6	meso-esestrolo	84-16-2	Ligando	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Idrocarburo (ciclico), fenolo	Prodotto farmaceutico e veterinario
7	Tamoxifen	10540-29-1	Ligando	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Idrocarburo (ciclico)	Prodotto farmaceutico e veterinario
8	Genisteina	446-72-0	Ligando	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Composto eterociclico, flavonoide	Prodotto naturale

N.	Nome della sostanza	Numero CAS (2)	Risposta prevista (3) (4)	Intervallo delle concentrazioni di prova (M)	Classe chimica nel sistema MeSH (5)	Classe di prodotto (6)
9	Bisfenolo A	80-05-7	Ligando	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Fenolo	Intermediario chimico
10	Zearalonone	17924-92-4	Ligando	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Composto eterociclico, lattone	Prodotto naturale
11	Butilparabene	94-26-8	Ligando	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Acido carbossilico, fenolo	Conservante
12	Atrazina	1912-24-9	Non ligando	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Composto eterociclico	Erbicida
13	Di-n-butilftalato (DBP) (7)	84-74-2	Non ligando (8)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Idrocarburo (ciclico), estere	Plasticizzante, intermediario chimico
14	Corticosterone	50-22-6	Non ligando	1×10^{-11} – 1×10^{-4}	Steroide	Prodotto naturale

(1) Se una sostanza chimica per la verifica della competenza tecnica non è più disponibile sul mercato, si può utilizzare una sostanza con la medesima classificazione di legame agli ER, attività biologica (*potency*) e classe chimica comparabili.
(2) Abbreviazioni: N.CAS (*Chemical Abstracts Service Registry Number*) = Numero CAS (numero di registrazione nell'inventario europeo delle sostanze chimiche).
(3) Classificazione come ligando o non ligando agli ERα durante lo studio di validazione per i saggi del CERI e di FW di legame all'hrER(2).
(4) L'affinità di legame agli ER era basata sui *Background Review Documents* (BRD) dell'ICCVAM per i saggi di legame agli ER e di TA ER (9) nonché su dati empirici e altre informazioni ottenuti da studi pubblicati e valutati (10) (11) (12) (13) (14) (15).
(5) Le sostanze sono state assegnate a una o più classi chimiche in base al sistema MeSH (*Medicine's Medical Subject Headings*) della Biblioteca nazionale di medicina degli USA, una classificazione standardizzata riconosciuta a livello internazionale (disponibile all'indirizzo: http://www.nlm.nih.gov/mesh).
(6) Le sostanze sono state assegnate a una o più classi di prodotto secondo la banca dati *Hazardous Substances Database* della Biblioteca nazionale di medicina degli USA (disponibile all'indirizzo: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)
(7) Il DBP può essere utilizzato come controllo non ligando alternativo a una concentrazione massima di 10^{-4} M.
(8) Il limite di solvibilità di questa sostanza è 10^{-4} M. L'uso e la classificazione dello ftalato di-*n*-butile (DBP) come non ligando sono stati basati su prove fino a 10^{-4} M, in quanto durante gli studi di prevalidazione alcuni laboratori avevano osservato che la sostanza era insolubile a 10^{-3} M (ad esempio, presentava torbidità).

Determinazione della solubilità e dell'intervallo delle concentrazioni delle sostanze chimiche in esame

19. Occorre effettuare una prova preliminare per determinare il limite di solubilità di ciascuna sostanza chimica in esame e per identificare l'intervallo delle concentrazioni appropriato da utilizzare durante l'esecuzione della prova. Il limite di solubilità di ciascuna sostanza chimica in esame deve essere inizialmente determinato nel solvente e ulteriormente confermato in condizioni sperimentali. La concentrazione finale testata nella prova non deve superare 1 mM. La prova per determinare l'intervallo delle concentrazioni consiste in un controllo con solvente più una serie logaritmica di otto diluizioni, partendo dalla concentrazione massima accettabile (ad es. 1 mM o meno, secondo il limite di solubilità), prendendo nota dell'eventuale presenza di torbidità o precipitato. Le concentrazioni nella seconda e nella terza prova devono essere opportunamente approssimate in modo da caratterizzare meglio la curva concentrazione-risposta.

Criteri di accettabilità della batteria di prove

20. L'accettazione o il rigetto di una batteria di prove si basa sulla valutazione dei risultati ottenuti per la sostanza estrogenica di riferimento e i controlli utilizzati per ciascun esperimento. Innanzitutto, per la piastra 1, le curve concentrazione-risposta complete ottenute per i controlli di riferimento di ciascun esperimento devono corrispondere alle misure della prestazione basate sui parametri di approssimazione delle curve (ad es. IC_{50} e pendenza di Hill) che derivano dai risultati dei saggi del CERI e di FW, rispettivamente (appendice 2 e 3), e dai dati storici relativi al controllo di cui dispone il laboratorio che ha condotto la prova. Per ogni esperimento devono essere correttamente classificati tutti i controlli (sostanza estrogenica di riferimento, ligando e non ligando). In secondo luogo, i controlli di tutte le piastre successive devono essere valutati per verificarne la coerenza con la piastra 1. È opportuno usare un intervallo di concentrazioni della sostanza chimica in esame sufficiente per definire chiaramente il vertice della curva di legame competitivo. La variabilità fra le repliche a ciascuna concentrazione della sostanza chimica in esame, così come tra le tre batterie di test indipendenti deve essere ragionevole e giustificabile sotto il profilo scientifico. Un laboratorio dimostra la propria capacità di ripetere un metodo di prova in modo omogeneo sviluppando e mantenendo una banca dati dei risultati storici ottenuti per la sostanza estrogenica di riferimento e per i controlli. Le deviazioni standard (SD) o i coefficienti di variazione (CV) delle medie dei parametri di approssimazione delle curve della sostanza estrogenica di riferimento e dei controlli di ligando debole ottenuti dopo multipli esperimenti possono essere utilizzati come misura di riproducibilità intralaboratorio. Si deve ricorrere al giudizio professionale di un esperto per analizzare i risultati dei controlli della piastra per ciascuna batteria di prove e per ciascuna sostanza chimica in esame.

Inoltre, devono essere rispettati i seguenti principi relativi ai criteri di accettabilità:

— i dati devono essere sufficienti per una valutazione quantitativa del legame agli ER;

— le concentrazioni testate devono rimanere nell'ambito dell'intervallo di solubilità della sostanza chimica in esame.

Analisi di dati

21. La procedura di analisi definita per i risultati delle prove di legame a saturazione e di legame competitivo deve essere conforme ai principi fondamentali di caratterizzazione delle interazioni recettore-ligando. I dati relativi al legame a saturazione sono generalmente analizzati applicando un modello di regressione non lineare che tiene conto del legame totale e non specifico. Può essere necessario eseguire una correzione per la perdita di ligando (ad es. Swillens, 1995 (19)) per determinare la capacità massima di legame B_{max} e la costante di legame K_d. I dati delle prove di legame competitivo sono generalmente trasformati (ad es. percentuale di legame specifico, logaritmo della concentrazione della sostanza chimica in esame). Le stime del log (IC_{50}) di ciascuna sostanza chimica in esame sono determinate utilizzando un idoneo software di approssimazione delle curve con regressione non lineare basato su un'equazione di Hill a quattro parametri. Dopo un'analisi iniziale, si determinano i parametri di approssimazione della curva e quindi si verifica visivamente se i dati relativi al legame corrispondono alla curva di legame competitivo ottenuta. In alcuni casi possono essere necessarie ulteriori analisi per ottenere un'approssimazione ottimale della curva (ad esempio, restringendo il vertice e/o la base della curva o applicando la regola del 10 % (cfr. l'appendice 4 e riferimento 2, sezione III.A.2).

22. Il rispetto dei criteri di accettabilità (paragrafo 20) indica che il sistema di prova funziona correttamente, ma non garantisce che qualsiasi prova produrrà dati accurati. La replicazione dei risultati corretti della prima batteria di prove è la migliore garanzia che i dati generati sono accurati.

Criteri generali di interpretazione dei dati

23. Attualmente non esiste alcun metodo universalmente concordato per l'interpretazione dei dati di una prova di legame agli ER. Tuttavia, la valutazione qualitativa (ad es. ligando/non ligando) e/o quantitativa (ad es. log IC_{50}, affinità di legame relativa (RBA), ecc.) dell'attività mediata dagli hrER deve fondarsi su basi empirici e giudizi scientificamente validi.

Relazione sull'esecuzione della prova

24. La relazione sull'esecuzione della prova deve comprendere le informazioni seguenti.

Metodo di prova:

— metodo di prova utilizzato;

Controllo/riferimento/sostanza chimica in esame

— origine, numero di lotto, data limite d'uso, se disponibili;

— stabilità della sostanza chimica in esame, se nota.

— solubilità e stabilità della sostanza chimica in esame nel solvente, se note;

— misurazione del pH, dell'osmolalità e del precipitato nel terreno di coltura al quale è stata aggiunta la sostanza chimica in esame, se del caso.

Sostanza monocostituente:

— aspetto fisico, idrosolubilità e ulteriori proprietà fisico-chimiche pertinenti;

— dati di identificazione chimica: denominazioni IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula strutturale, identità chimica o impurezze, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc.

Sostanza multicostituente, UVCB e miscele:

— caratterizzate, per quanto possibile mediante l'identità chimica (cfr. sopra), la presenza quantitativa e le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti.

Solvente/mezzo disperdente:

— Caratterizzazione (natura, fornitore e lotto);

— motivazione della scelta del solvente/mezzo disperdente;

— solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/mezzo disperdente, se note.

Recettori:

— origine dei recettori (fornitore, n. di riferimento, lotto, tipo di recettore, concentrazione dei recettori attivi indicata dal fornitore, certificazione del fornitore);

— caratterizzazione dei recettori (compresi i risultati delle prove di legame a saturazione): K_d, B_{max},

— stoccaggio dei recettori.

— *Ligando radiomarcato:*

— fornitore, numero di riferimento, lotto, attività specifica.

Condizioni sperimentali:

— limiti di solubilità in condizioni sperimentali;

— composizione della soluzione tamponata della prova di legame;

— concentrazione di recettore;

— concentrazione di tracciante (ossia, ligando radiomarcato);

— Concentrazione di sostanza chimica in esame;

— percentuale di mezzo disperdente nella prova finale;

— temperatura e tempo di incubazione;

— metodo di separazione dei ligandi legati/liberi;

— controlli/sostanze di riferimento positivi e negativi;

— criteri in base ai quali i risultati sono considerati positivi, negativi o equivoci.

Verifica dell'accettabilità:

— valori reali di IC_{50} e pendenza di Hill per controlli positivi e le sostanze di riferimento inclusi nella prova di legame competitivo.

Risultati:

— dati grezzi, dati relativi ai ligandi legati/liberi;

— verifica della denaturazione, se del caso;

— se esiste, la più bassa concentrazione efficace (LEC);

— valori RBA e/o IC_{50}, come opportuno;

— relazione concentrazione-risposta, se possibile;

— eventuali analisi statistiche, corredate della misurazione dell'errore e della confidenza (ad es. SEM, SD, CV o IC 95 %) e di una descrizione di come sono stati ottenuti tali valori.

Discussione dei risultati:

— applicazione della regola del 10 %.

Conclusione

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: p.20-6.

(6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr.* Relat. Cancer., 16(4): p. 1073-89.

(7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol.* Lab. Med., 135(1): p. 63-6.

(8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, Endo Rev 30(4):293-342.

(9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

(10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro,* 22(1): 225-231.

(13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. p. 1-188.

(15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, Toxicol. Letters, 146: 111-120.

(16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol*. Letters, 180: 213-221.

(17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol*., 196: 58-67.

(18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. Chemosphere, 34: 835-848.

(19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, Mol Pharmacol 47(6):1197-1203.

Appendice 1

DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI

Regola del 10 %: opzione che permette di escludere dei punti di dati dalle analisi quando la percentuale di legame specifico media del [^{3}H]-17β-estradiolo per tutte le repliche di una concentrazione supera del 10 % o più la media corrispondente a una concentrazione inferiore (cfr. l'appendice 4).

Criteri di accettabilità: requisiti minimi di prestazione relativi ai controlli sperimentali e agli standard di riferimento. Tutti i criteri di accettabilità devono essere soddisfatti affinché un metodo di prova sia considerato valido.

Accuratezza (concordanza): grado di concordanza tra i risultati ottenuti con il metodo di prova e i valori di riferimento accettati. Misura l'efficienza del metodo di prova e costituisce un aspetto della pertinenza. Il termine è spesso utilizzato come sinonimo di "concordanza" per indicare la proporzione dei risultati corretti di un metodo di prova (1).

CF: quadro concettuale dell'OCSE per la sperimentazione e la valutazione degli interferenti endocrini.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

CV: coefficiente di variazione.

E2: 17β-estradiolo

ED: (*Endocrine disruption*): interferenza con il sistema endocrino

hERα: recettore estrogenico alfa umano

ER: recettore estrogenico

Attività estrogenica: capacità di una sostanza chimica di mimare la capacità del 17β-estradiolo di legarsi ai recettori di estrogeni. Il legame con l'hERα può essere individuato con il presente metodo di prova.

IC_{50}: concentrazione efficace di una sostanza chimica in esame che induce la metà dell'effetto massimo di inibizione.

ICCVAM: *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (comitato di coordinamento interagenzie per la validazione di metodi alternativi).

Riproducibilità inter-laboratori: espressione della misura in cui laboratori qualificati diversi possano ottenere, seguendo lo stesso protocollo e testando le stesse sostanze di prova, risultati simili in termini qualitativi e quantitativi. La riproducibilità inter-laboratori è determinata nel corso dei processi di pre-validazione e validazione e indica la misura in cui un metodo di prova può essere trasferito con successo tra laboratori; è detta anche riproducibilità tra laboratori (1).

Riproducibilità intra-laboratorio: espressione della misura in cui membri diversi del personale qualificato all'interno del medesimo laboratorio riescono a ottenere risultati simili da una prova effettuata seguendo un protocollo specifico in momenti diversi; è detta anche "riproducibilità all'interno dello stesso laboratorio" (1).

LEC: la concentrazione minima della sostanza chimica in esame che produce una risposta (ossia la più bassa concentrazione della sostanza chimica in esame alla quale l'incremento dell'effetto indotto è statisticamente diverso da quello del concomitante controllo con mezzo disperdente).

Test strutturalmente analoghi: espressione che indica un metodo di prova strutturalmente e funzionalmente analogo a un metodo di prova di riferimento validato e accettato. È sinonimo di "metodo di prova simile".

PBTG: (*Performance-Based Test Guideline*) Linea guida basata su standard di prestazione

Standard di prestazione: standard, basati su un metodo di riferimento validato, che consentono di valutare la comparabilità di un metodo proposto che è simile sotto il profilo strutturale e funzionale. Comprendono: 1) gli elementi essenziali del metodo di prova; 2) un elenco minimo di sostanze chimiche di riferimento scelte tra le sostanze utilizzate per dimostrare le prestazioni accettabili del metodo di prova validato; e 3) in funzione dei risultati ottenuti con il metodo di prova validato, i livelli comparabili di accuratezza e affidabilità che il metodo proposto dovrebbe ottenere quando viene valutato utilizzando l'elenco minimo di sostanze chimiche di riferimento (1).

Sostanze di prova ai fini di competenza: sottoinsieme delle sostanze di riferimento incluse negli standard di prestazione che possono essere utilizzate dai laboratori per dimostrare la competenza tecnica ad effettuare un metodo di prova standardizzato. In generale, i criteri di selezione per tali sostanze includono la rappresentatività di tutta la gamma delle risposte, la loro disponibilità sul mercato e l'esistenza di dati di riferimento di elevata qualità a loro corredo.

Competenza: la capacità di eseguire correttamente un metodo di prova, dimostrata prima di testare sostanze sconosciute.

Sostanza estrogenica di riferimento: 17ß-estradiolo (E2, CAS 50-28-2).

Metodi di prova di riferimento: i saggi su cui si basa la linea guida PBTG 493.

RBA: *Relative Binding Affinity*. Affinità di legame relativa. La RBA di una sostanza è espressa in percentuale del log(IC_{50}) della sostanza in rapporto al log(IC_{50}) del 17β-estradiolo.

Pertinenza: descrizione del rapporto tra la prova e l'effetto studiato; indica se la prova è significativa e utile per uno scopo specifico. È il grado con cui la prova misura o prevede correttamente l'effetto biologico di interesse. La pertinenza comprende una valutazione dell'accuratezza (concordanza) di una prova (1).

Affidabilità: misura in cui l'esecuzione di un metodo di prova può essere riprodotta nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi seguendo il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità intra-laboratorio e inter-laboratori.

SD: deviazione standard

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata applicando il presente metodo di prova.

Metodo di prova validato: saggio per il quale sono stati completati studi di validazione volti a determinare la pertinenza (compresa l'accuratezza) e l'affidabilità per uno scopo specifico. Va sottolineato che un metodo di prova validato potrebbe non avere una prestazione sufficiente in termini di accuratezza e affidabilità per essere ritenuto accettabile per lo scopo determinato (1).

Validazione: il processo mediante il quale si stabilisce l'affidabilità e la pertinenza di uno specifico approccio, metodo, saggio, processo o di una specifica valutazione per un determinato scopo (1).

Appendice 2

SAGGIO DI FREYBERG-WILSON (FW) RELATIVO ALLE PROVE IN VITRO DI LEGAME A SATURAZIONE E DI LEGAME COMPETITIVO AI RECETTORI ESTROGENICI (ERA) CHE UTILIZZA L'INTERA LUNGHEZZA DI UN ERA RICOMBINANTE

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI (CFR. ANCHE INTRODUZIONE GENERALE)

1. Il presente metodo di prova *in vitro* di legame a saturazione e di legame competitivo ai recettori estrogenici (ERα) utilizza l'intera lunghezza del recettore estrogenico alfa umano ERαα(hrERα), prodotto e isolato a partire da cellule di insetti infettati da baculovirus. Il protocollo, sviluppato da Freyberger e Wilson, è stato sottoposto a uno studio internazionale di validazione realizzato da diversi laboratori (2) che ha dimostrato la pertinenza e l'affidabilità di questo metodo di prova per gli scopi previsti.

2. Il presente metodo di prova costituisce una procedura di screening per individuare le sostanze che possono legarsi all'intera lunghezza dell'hrERα; è utilizzato per determinare la capacità di una sostanza chimica in esame di competere con il 17β-estradiolo nel legarsi all'hrERα. I risultati sotto il profilo quantitativo possono comprendere il valore IC_{50} (la concentrazione della sostanza chimica in esame necessaria per spiazzare la metà del [^{3}H]-17β-estradiolo legato all'hrERα) e le affinità di legame relative delle sostanze chimiche in esame per l'hrERα rispetto al 17β-estradiolo. Ai fini dello screening chimico, i risultati accettabili sotto il profilo qualitativo possono comprendere la classificazione delle sostanze chimiche in esame come ligandi o non ligandi dell'hrERα, oppure generanti una risposta equivoca, in funzione dei criteri descritti per le curve di legame.

3. Atteso che il metodo di prova utilizza un ligando radioattivo, il laboratorio deve richiedere una licenza per trattare materiali radioattivi. Tutte le procedure che implicano radioisotopi e sostanze chimiche pericolose devono essere conformi ai regolamenti e alle procedure stabiliti dalla legislazione nazionale.

4. Le sezioni "**INTRODUZIONE GENERALE**" e "**COMPONENTI DEL METODO DI PROVA DI LEGAME ALL'-hrER**" vanno lette prima di applicare il presente metodo di prova per fini regolamentari. Le definizioni e le abbreviazioni utilizzate nella presente linea guida figurano nell'appendice 1.

PRINCIPI DEL METODO DI PROVA (CFR. ANCHE INTRODUZIONE GENERALE)

5. La prova di legame al recettore hrERα misura la capacità di un ligando radiomarcato ([^{3}H]-17β-estradiolo) di legarsi agli ER in presenza di concentrazioni crescenti di una sostanza chimica in esame (denominata "competitore"). Le sostanze chimiche in esame che presentano un'alta affinità di legame agli ER competono con il ligando radiomarcato a una concentrazione inferiore rispetto alle sostanze chimiche che hanno una più debole affinità per il recettore.

6. Il presente metodo di prova consta di due componenti principali: un esperimento di legame a saturazione per caratterizzare i parametri di interazione recettore-ligando, seguito da un esperimento di legame competitivo per determinare in che misura una sostanza chimica in esame compete con un ligando radiomarcato per legarsi agli ER.

7. Scopo dell'esperimento di legame a saturazione è caratterizzare il numero e l'affinità di legame dei recettori di un particolare lotto in vista dell'esperimento di legame competitivo. L'esperimento di legame a saturazione misura, in condizioni di equilibrio, l'affinità di una concentrazione fissa di recettori degli estrogeni rispetto al loro ligando naturale (rappresentata dalla costante di dissociazione, K_d) e la concentrazione di siti recettori attivi (B_{max}).

8. L'esperimento di legame competitivo misura l'affinità di una sostanza a legarsi agli ER in competizione con il [^{3}H]-17β-estradiolo. L'affinità è quantificata dalla concentrazione della sostanza in esame che, in condizioni di equilibrio, inibisce il 50 % del legame specifico del [^{3}H]-17β-estradiolo (definita «concentrazione che induce il 50 % di inibizione» o «IC_{50}»). Essa si può esprimere anche come l'affinità di legame relativa (RBA, calcolata in rapporto all'IC_{50} di estradiolo misurata separatamente nell'ambito della stessa prova). L'esperimento di legame competitivo misura il legame del [^{3}H]-17β-estradiolo a una concentrazione fissa in presenza di un ampio intervallo (otto ordini di grandezza) di concentrazioni della sostanza chimica in esame. I dati sono quindi approssimati, ove possibile, a una forma dell'equazione di Hill (Hill, 1910) che descrive lo spiazzamento del ligando radiomarcato da parte di un ligando competitore su un sito unico. L'ampiezza dello spiazzamento dell'estradiolo radiomarcato, in condizioni di equilibrio, è utilizzata per caratterizzare la sostanza chimica in esame come ligando, non ligando o generante una risposta equivoca.

PROCEDURA

Dimostrazione dell'accettabilità della prestazione della proteina hrERα

9. Prima di effettuare le prove di routine relative al legame competitivo e al legame a saturazione, si deve verificare che ciascun lotto di hrERα stia funzionando correttamente nel laboratorio in cui sarà utilizzato. Un processo in due fasi è applicato per dimostrare tale prestazione. Le due fasi in questione consistono in:

— una prova di legame a saturazione [^{3}H]-17β-estradiolo per dimostrare la specificità e la saturazione dell'hrERα. Un'analisi di regressione non lineare dei dati ottenuti (ad es. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) e il grafico di Scatchard così ottenuto documenteranno l'affinità di legame all'hrERα del [^{3}H]-17β-estradiolo (K_d) e il numero di recettori attivi (B_{max}) per ciascun lotto di hrERα.

— una prova di legame competitivo utilizzando le sostanze di controllo (sostanza estrogenica di riferimento 17β-estradiolo), un ligando debole (ad esempio, noretinodrel o noretindrone) e un non ligando (ottiltrietossisilano, OTES). Ciascun laboratorio è tenuto a creare una banca dati storica per documentare che l'IC_{50} e gli altri valori pertinenti per la sostanza estrogenica di riferimento e un ligando debole rimangono coerenti tra una prova e l'altra e tra i diversi lotti di hrERα. I parametri delle curve di legame competitivo per le sostanze di controllo devono rientrare nei limiti dell'intervallo di confidenza del 95 % (cfr. la tabella 1) sviluppati utilizzando i dati dei laboratori che hanno partecipato allo studio di validazione della prova (2).

Tabella 1

Criteri di prestazione sviluppati per la sostanza estrogenica di riferimento e il ligando debole nella prova di legame all'hrER di FW

Sostanza	Parametro	Media [a]	Deviazione standard (n)	Intervallo di confidenza al 95 % [b]	
				Limite inferiore	Limite superiore
17β-estradiolo	Vertice (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Base (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Pendenza di Hill	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	LogIC_{50} (M)	-8,92 [c]	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Noretinodrel	Vertice (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Base (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Pendenza di Hill	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC_{50} (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretindrone [c]	Vertice (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Base (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Pendenza di Hill	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	LogIC_{50} (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

[a] I valori medi (n) ± deviazione standard (SD) sono stati calcolati utilizzando le stime dei parametri di approssimazione delle curve (equazione di Hill a 4 parametri) per le batterie di prove di controllo condotte in quattro laboratori durante lo studio di validazione (cfr. l'allegato N del riferimento 2).

[b] Gli intervalli di confidenza al 95 % sono forniti come guida per i criteri di accettabilità.

[c] La sperimentazione sul noretindrone era facoltativa per la fase 4 dello studio di validazione (cfr. riferimento 2, Subtask 4). Pertanto, i valori medi ± SD (n) sono stati calcolati utilizzando le stime dei parametri di approssimazione delle curve (equazione di Hill a 4 parametri) per i controlli effettuati in due laboratori.
L'intervallo per l'IC_{50} dipenderà dalla K_d della preparazione dei recettori e dalla concentrazione del ligando radiomarcato utilizzato in ciascun laboratorio. È consentito effettuare le idonee approssimazioni per l'intervallo di IC_{50} in funzione delle condizioni utilizzate per condurre la prova.

Dimostrazione delle competenze del laboratorio

10. Cfr. i paragrafi 17 e 18 e la Tabella 2 nella sezione **"ELEMENTI DEL METODO DI PROVA DI LEGAME ALL'hrER"** del presente metodo di prova. Ciascuna prova (di legame a saturazione e di legame competitivo) deve consistere in tre batterie indipendenti di prove (ossia con nuove diluizioni di recettore, sostanze chimiche e reagente) condotte in giorni differenti, e ciascuna batteria di prove deve comportare tre repliche.

Determinazione della concentrazione di recettore (hrERα)

11. La concentrazione di recettori attivi varia leggermente in funzione del lotto e delle condizioni di conservazione. Per questo motivo, occorre determinare la concentrazione di recettori attivi del lotto ricevuto dal fornitore. Questa fase permette di ottenere la concentrazione esatta di recettori attivi al momento della prova.

12. Alle stesse condizioni della prova di legame competitivo (ossia, [^{3}H]-estradiolo a 1 nM), le concentrazioni nominali di 0,25, 0,5 0,75 e 1 nM di recettore sono incubate in assenza (legame totale) e in presenza (legame non specifico) di estradiolo non marcato a 1 μM. Il legame specifico, calcolato come differenza tra il legame totale e il legame non specifico, è rappresentato graficamente in funzione della concentrazione nominale di recettore. La concentrazione di recettore alla quale il legame specifico corrisponde al 20 % del ligando radiomarcato aggiunto permette di dedurre la concentrazione nominale del recettore; quest'ultima è utilizzata per esperimenti di legame a saturazione e di legame competitivo. Frequentemente, tale condizione è soddisfatta da una concentrazione finale di hrER di 0,5 nM.

13. Se il criterio del 20 % fallisce ripetutamente, occorre verificare l'impianto sperimentale per individuare eventuali errori. Il mancato raggiungimento del criterio del 20 % può indicare che il lotto di recettori ricombinanti contiene pochissimi siti attivi; occorre quindi considerare il ricorso a un altro lotto di recettori.

Prova a saturazione

14. Sono valutate otto concentrazioni crescenti di [^{3}H]-17β-estradiolo in triplicato, rispettando le tre condizioni seguenti (cfr. tabella 2):

— In assenza di 17β-estradiolo non marcato e in presenza di ER. Questa condizione permette di determinare il legame totale misurando la radioattività nei pozzetti che contengono soltanto [^{3}H]-17β-estradiolo.

— In presenza di una concentrazione di 17β-estradiolo non marcato 1 000 volte superiore a quella di 17β-estradiolo radiomarcato e in presenza di ER. Questa condizione è intesa a saturare i siti di legame attivi con 17β-estradiolo non marcato e a determinare il legame non specifico misurando la radioattività presente nei pozzetti. Si considera che l'estradiolo caldo (radiomarcato) eventualmente rimanente capace di legarsi al recettore si leghi a un sito non specifico, in quanto l'estradiolo freddo (non marcato) deve essere in concentrazione talmente elevata da legarsi a tutti i siti specifici disponibili sul recettore.

— In assenza di 17β-estradiolo non marcato e in assenza di ER (determinazione della radioattività totale).

Preparazione di soluzioni di [^{3}H]-17β-estradiolo e di 17β-estradiolo non marcato

15. Le diluizioni di [^{3}H]-17β-estradiolo sono preparate aggiungendo il tampone di prova a 12 nM di soluzione madre di [^{3}H]-17β-estradiolo per ottenere concentrazioni che inizialmente vanno da 0,12 nM a 12 nM. Aggiungendo 40 μl di tali diluizioni ai rispettivi pozzetti di prova di una piastra da microtitolazione a 96 pozzetti (per un volume finale di 160 μl), si otterranno le concentrazioni finali della prova, che vanno da 0,03 a 3,0 nM. La preparazione del tampone di prova, della soluzione madre di [^{3}H]-17β-estradiolo e delle diluizioni e la determinazione delle concentrazioni sono descritte in dettaglio nel protocollo di FW (2).

16. Le diluizioni delle soluzioni etanoliche di 17β-estradiolo sono preparate aggiungendo il tampone di prova in modo da ottenere otto concentrazioni crescenti che inizialmente vanno da 0,06 μM a 6 μM. Aggiungendo 80 μl di tali soluzioni ai rispettivi pozzetti di prova di una piastra da microtitolazione a 96 pozzetti (in un volume finale di 160 μl), si otterranno le concentrazioni finali, che vanno da 0,03 μM a 3 μM. La concentrazione finale di 17β-estradiolo non marcato in ciascun pozzetto di prova di legame non specifico deve essere 1 000 volte superiore alla concentrazione del [^{3}H]-17β- estradiolo radiomarcato. La preparazione di diluizioni di 17β-estradiolo non marcato è descritta in dettaglio nel protocollo di FW (2).

17. Per la prova, va utilizzata la concentrazione nominale del recettore che produce un legame specifico di 20 ± 5 % (cfr. i paragrafi 12 e 13). La soluzione di hrERα deve essere preparata immediatamente prima dell'uso.

18. Le piastre da microtitolazione a 96 pozzetti sono preparate come illustrato nella tabella 2, con 3 repliche per concentrazione. L'appendice 2.2 contiene un esempio di piastra indicante la concentrazione e la distribuzione dei volumi di [^{3}H]-17β-estradiolo, di 17β-estradiolo non marcato, della soluzione tamponata e del recettore.

Tabella 2

Configurazione della piastra da microtitolazione nella prova di legame a saturazione

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,10 nM [^{3}H] E_2 + ER			Legame totale (solvente)
B	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,03 μM E_2			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,06 μM E_2			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,08 μM E_2			0,10 nM [3H] E_2 + ER + 0,10 μM E_2			Legame non specifico
E	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,30 μM E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,60 μM E_2			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 1,0 μM E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 3,0 μM E_2			
F													
G													
H													

[3H] E2: [^{3}H]-17β-estradiolo
ER: recettore degli estrogeni
E_2: 17β-estradiolo non marcato

19. Le piastre da microtitolazione per la prova sono incubate tra 2 e 8 °C per 16-20 ore e sottoposte a rotazione durante il periodo di incubazione.

Misurazione del [^{3}H]-17β-estradiolo legato all'hrERα

20. Per separare il [^{3}H]-17β-estradiolo legato all'hrERα dal [^{3}H]-17β-estradiolo libero, si aggiungono 80 μl di sospensione fredda di DCC in ciascun pozzetto, quindi le piastre da microtitolazione sono agitate per 10 minuti e infine centrifugate a circa 2 500 giri al minuto. Per ridurre al minimo la dissociazione del [^{3}H]-17β-estradiolo dall'hrERα durante questo processo, è estremamente importante che le soluzioni tamponate e i pozzetti di prova siano mantenuti tra 2 e 8 °C e che ciascuna fase sia eseguita rapidamente. Un agitatore per le piastre da microtitolazione è necessario per un trattamento efficace e rapido delle piastre.

21. Prelevare quindi 50 μl del supernatante contenente il [^{3}H]-17β-estradiolo legato all'hrERα con estrema cura, in modo da evitare qualsiasi contaminazione dei pozzetti per contatto con il DCC, e collocarli in una seconda piastra da microtitolazione.

22. Aggiungere 200 μl di liquido di scintillazione, in grado di convertire l'energia cinetica delle emissioni nucleari in energia luminosa, in ciascun pozzetto (da A1 a B12 e da D1 a E12). I pozzetti G1-H12 (identificati come disintegrazioni al minuto - dpm - totali) rappresentano le diluizioni successive del [^{3}H]-17β-estradiolo (40 μl) da versare direttamente nel liquido di scintillazione nei pozzetti della piastra di misurazione, come indicato nella tabella 3; questi pozzetti contengono quindi solo 200 μl di liquido di scintillazione e la diluizione appropriata di [^{3}H]-17β-estradiolo. Queste misurazioni indicano la quantità di [^{3}H]-17β-estradiolo (espressa in dpm) aggiunta a ciascuna serie di pozzetti per il legame totale e il legame non specifico.

Tabella 3

Configurazione della piastra da microtitolazione nella prova di legame a saturazione, misurazione della radioattività

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,10 nM [^{3} H] E_2 + ER			Legame totale (solvente)
B	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,03 µM E_2			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,06 µM E_2			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,08 µM E_2			0,10 nM [3H] E_2 + ER + 0,10 µM E_2			Legame non specifico
E	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,30 µM E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,60 µM E_2			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 1,0 µM E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 3,0 µM E_2			
F													
G	0,03 nM [3H] E_2 (totale in dpm)			0,06 nM [3H] E_2			0,08 nM [3H] E_2			0,10 nM [3H] E_2			(totale in dpm) (*)
H	0,30 nM [^{3}H] E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2			1,0 nM [^{3}H] E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2			

[3H] E2: [^{3}H]-17β-estradiolo
ER: recettore degli estrogeni
E2: 17β-estradiolo non marcato
dpm: disintegrazioni al minuto.
(*) Le diluizioni in serie di estradiolo caldo (marcato) sono aggiunte direttamente ai 200 µl di liquido di scintillazione nei pozzetti G1 – H12.

23. La misurazione della scintillazione inizia almeno due ore dopo l'aggiunta, e dura 40 minuti per pozzetto. Per la determinazione delle disintegrazioni al minuto si usa un contatore a scintillazione per piastre da microtitolazione, applicando una correzione dell'attenuazione. In alternativa, se non si dispone di un contatore a scintillazione, i campioni possono essere misurati mediante un contatore convenzionale. In tali condizioni può essere presa in considerazione una riduzione del tempo di misurazione.

Prova di legame competitivo

24. La prova di legame competitivo misura i legami di [^{3}H]-17β-estradiolo in concentrazione fissa in presenza di concentrazioni crescenti della sostanza chimica in esame. Per ciascuna concentrazione si dovranno utilizzare tre repliche concomitanti nella stessa batteria di prove. Inoltre, per ogni sostanza chimica sottoposta a prova devono essere effettuate tre batterie di prove non concomitanti. La prova richiede una o più piastre da microtitolazione a 96 pozzetti.

Controlli

25. Durante l'esecuzione della prova vanno inclusi in ciascun esperimento il solvente e i controlli concomitanti (ossia, la sostanza estrogenica di riferimento, ligando debole e non ligandi). Per ciascuna batteria di prove, una medesima piastra deve essere utilizzata per stabilire le curve di tutte le concentrazioni della sostanza estrogenica di riferimento e dei controlli (ossia, ligando debole e non ligando). Tutte le altre piastre devono contenere: i) una concentrazione elevata (massimo spiazzamento) e media (corrispondente circa alla IC_{50}) di E2 e un ligando debole in triplicato; ii) il controllo con solvente e ligandi non specifici, ciascuno almeno in triplicato. Le procedure per la preparazione della soluzione tamponata, dei controlli, del [^{3}H]-17β-estradiolo, dell'hrERα e delle soluzioni della sostanza chimica in esame sono descritte nel riferimento 2 (allegato K, cfr. protocollo di FW).

Controllo con solvente:

26. Il controllo trattato solo con il solvente conferma che il solvente non interagisce con il sistema di prova e permette di misurare il legame totale. Di preferenza si utilizzerà l'etanolo come solvente. In alternativa, se la concentrazione massima della sostanza chimica in esame non è solubile in etanolo, si può usare il DMSO. Alla fine della prova, la concentrazione di etanolo finale o DMSO, se utilizzato, sarà pari all'1,5 % nei pozzetti di prova e non dovrà superare il 2 %.

Controllo con soluzione tamponata:

27. Il controllo con soluzione tamponata contiene tutti gli altri elementi della prova, tranne il solvente e la sostanza chimica in esame. I risultati del controllo con soluzione tamponata sono confrontati con il controllo con solvente per verificare che il solvente utilizzato non interferisca con il sistema di prova.

Ligando forte (sostanza estrogenica di riferimento)

28. Il 17β-estradiolo (CAS 50-28-2) è il ligando endogeno che presenta una forte affinità di legame all'ER di tipo alfa. Si rappresenti una curva standard utilizzando il 17β-estradiolo non marcato per ciascuna prova di legame competitivo all'hrERα, al fine di valutare la variabilità delle prove condotte nel corso del tempo nello stesso laboratorio. Otto soluzioni di 17β-estradiolo non marcato sono preparate nell'etanolo, con concentrazioni nei pozzetti di prova che variano da 100 nM a 10 pM (-7[logM] a -11[logM]), distanziate come segue: (-7[logM], -8[logM], -8,5[logM], -9[logM], - 9,5[logM], -10[logM], -11[logM]). La concentrazione più elevata di 17β-estradiolo non marcato (1 μM) serve anche da indicatore di legame non specifico. Tale concentrazione è distinta dall'indicazione «NSB» nella tabella 4, sebbene faccia parte anche della curva standard.

Ligando debole

29. Per dimostrare la sensibilità di ciascun esperimento e consentire una valutazione della variabilità delle prove condotte nel corso del tempo, si deve includere un ligando debole (noretinodrel (CAS68-23-5) o noretindrone (CAS 68-22-4). Otto soluzioni di ligando debole sono preparate nell'etanolo, con concentrazioni nei pozzetti di prova che variano da 3 nM a 30 pM (-8,5[logM] a -4,5[logM]), distanziate come segue: -4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6,5[logM], -7[logM],-7,5[logM], -8,5[logM].

Non ligando

30. Si utilizzi l'ottiltrietossisilano (OTES, CAS 2 943-75-1) come controllo negativo (non ligando). Esso garantisce che la prova, così come è condotta, permetterà di individuare le sostanze chimiche in esame che non si legano all'hrERα. Otto soluzioni di non ligando debole sono preparate nell'etanolo, con concentrazioni nei pozzetti di prova che variano da 0,1 nM a 1 000 μM (-10[logM] a -3[logM]), distanziate con incrementi logaritmici. Lo ftalato di di-*n*-butile (DBP) può essere utilizzato come controllo non ligando alternativo. È stato dimostrato che la sua solubilità massima è -4[logM].

Concentrazione di hrERα

31. Occorre utilizzare la quantità di recettore che produce un legame specifico di 20 ± 5 % del ligando radiomarcato a 1 nM (cfr. i paragrafi 12 e 13 dell'allegato 2). La soluzione di hrERα deve essere preparata immediatamente prima dell'uso.

[^{3}H]-17β-estradiolo

32. La concentrazione di [^{3}H]-17β-estradiolo nei pozzetti di prova deve essere di 1,0 nM.

Sostanze chimiche in esame

33. Occorre effettuare una prova preliminare per determinare il limite di solubilità di ciascuna sostanza chimica in esame e per identificare l'intervallo delle concentrazioni appropriato da utilizzare durante l'esecuzione del protocollo sperimentale. Il limite di solubilità di ciascuna sostanza chimica in esame deve essere inizialmente determinato nel solvente e ulteriormente confermato in condizioni sperimentali. La concentrazione finale della prova non dovrebbe superare 1 mM. La prova per determinare l'intervallo delle concentrazioni consiste in un controllo con solvente più una serie logaritmica di 8 diluizioni della concentrazione massima accettabile (ad es. 1 mM o meno, secondo il limite di solubilità). Si noterà l'apparizione di torbidità o precipitato (cfr. anche paragrafo 35). La sostanza chimica testata è analizzata mediante le curve ottenute per la serie logaritmica di otto concentrazioni stabilite dalla prova di determinazione dell'intervallo (*range-finding test*) condotta precedentemente. Le concentrazioni nella seconda e nella terza prova devono essere opportunamente approssimate in modo da caratterizzare meglio la curva concentrazione-risposta.

34. Le diluizioni della sostanza chimica in esame vanno preparate nel solvente appropriato (cfr. il paragrafo 26 dell'appendice 2). Se la concentrazione più elevata della sostanza chimica in esame non è solubile in etanolo o in DMSO e se aggiungendo più solvente la concentrazione del solvente nei pozzetti a fine prova risulta superiore al limite accettabile, la concentrazione più elevata può essere ridotta alla concentrazione immediatamente inferiore. In tal caso, è possibile aggiungere una concentrazione supplementare all'inizio della serie di concentrazioni. Le altre concentrazioni della serie rimangono invariate.

35. I pozzetti di prova sono monitorati attentamente durante l'aggiunta delle soluzioni della sostanza chimica in esame, in quanto tale aggiunta può provocare un precipitato. I dati relativi a tutti i pozzetti che contengono precipitato vanno esclusi dall'approssimazione della curva e la ragione di esclusione dei dati va riportata.

36. Se esistono informazioni precedenti provenienti da altre fonti che forniscono dati sul log(IC_{50}) di una sostanza chimica in esame, può essere opportuno ripartire geometricamente le diluzioni (ossia, 0,5 unità logaritmiche attorno al log(IC_{50}) atteso. Il risultato finale deve corrispondere a un intervallo di concentrazioni sufficientemente ripartite ai due lati del log(IC_{50}), compresi il vertice (*top*) e la base (*bottom*) della curva di legame, al fine di caratterizzarla in modo adeguato.

Configurazione della piastra di prova

37. Le piastre da microtitolazione comprendono serie di sei repliche incubate, distinte con codici corrispondenti al controllo con solvente, alla concentrazione più elevata di sostanza estrogenica di riferimento che serve anche come indicatore di legame non specifico (NSB), e al controllo della soluzione tamponata, nonché le incubazioni in triplicato codificate per ciascuna delle otto concentrazioni del controllo non ligando (ottiltrietossisilano), le sette concentrazioni inferiori della sostanza estrogenica di riferimento, le otto concentrazioni del ligando debole e le otto concentrazioni di ciascuna sostanza chimica in esame (TC). Un esempio di configurazione della piastra di prova per ottenere curve complete a partire da tutte le concentrazioni della sostanza estrogenica di riferimento e i controlli è riportato nella tabella 4. Piastre da microtitolazione aggiuntive sono utilizzate per le sostanze chimiche in esame e includono: 1) una concentrazione elevata (massimo spiazzamento) e una concentrazione media (circa IC_{50}) di E2 e del ligando debole in triplicato; 2) controlli con solvente e ligandi non specifici, ciascuno in sei repliche (tabella 5). Nell'appendice 2.3 è riportato un esempio di configurazione della piastra da microtitolazione per la prova di legame competitivo di tre sostanze sconosciute. Le concentrazioni indicate nelle tabelle 4 e 5 sono le concentrazioni finali della prova. La concentrazione massima di E2 deve essere pari a 1×10^{-7} M mentre, per il ligando debole, è utilizzata la concentrazione più elevata della piastra 1. La concentrazione IC_{50} è determinata dal laboratorio a partire della sua banca dei dati storici. Si prevede che questo valore sarà analogo a quello osservato negli studi di validazione (cfr. tabella 1).

Tabella 4

Configurazione della piastra da microtitolazione per la prova di legame competitivo, curve concentrazione-risposta complete per la sostanza estrogenica di riferimento e i controlli (piastra 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (Solo solvente)			TB (Solo solvente)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10-7)			E2 (1×10-8)			E2 (1×10-8,5)			E2 (1×10-9)		
C	E2 (1×10-9,5)			E2 (1×10-10)			E2 (1×10-11)			Bianco (*)		
D	NE (1×10-4,5)			NE (1×10-5)			NE (1×10-5,5)			NE (1×10-6)		
E	NE (1×10-6,5)			NE (1×10-7)			NE (1×10-7,5)			NE (1×10-8,5)		
F	OTES (1×10-3)			OTES (1×10-4)			OTES (1×10-5)			OTES (1×10-6)		
G	OTES (1×10-7)			OTES (1×10-8)			OTES (1×10-9)			OTES (1×10-10)		
H	Bianco (E2 caldo) (**)			Bianco (E2 caldo) (**)			Controllo con tampone			Controllo con tampone		

In questo esempio, il ligando debole è noretinodrel (NE)
(*) bianco reale, pozzetti non utilizzati
(**) bianco non usato durante l'incubazione, ma usato per confermare la radioattività totale aggiunta.

Tabella 5

Configurazione della piastra da microtitolazione per la prova di legame competitivo, curve concentrazione-risposta complete per le sostanze chimiche in esame e i controlli della piastra

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (Solo solvente)			TB (Solo solvente)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10-3)			TC1 (1×10-4)			TC1 (1×10-5)			TC1 (1×10-6)		
C	TC1 (1×10-7)			TC1 (1×10-8)			TC1 (1×10-9)			TC1 (1×10-10)		
D	TC2 (1×10-3)			TC2 (1×10-4)			TC2 (1×10-5)			TC2 (1×10-6)		
E	TC2 (1×10-7)			TC2 (1×10-8)			TC2 (1×10-9)			TC2 (1×10-10)		
F	TC3 (1×10-3)			TC3 (1×10-4)			TC3 (1×10-5)			TC3 (1×10-6)		
G	TC3 (1×10-7)			TC3 (1×10-8)			TC3 (1×10-9)			TC3 (1×10-10)		
H	NE (IC_{50})			NE (1×10-4,5)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10-7)		

In questo esempio, il ligando debole è noretinodrel (NE)

Completamento della prova di legame competitivo

38. Come indicato nella tabella 6, ai pozzetti vanno aggiunti 80 µl di controllo con solvente, di controllo con soluzione tamponata, di sostanza estrogenica di riferimento, di ligando debole, di non ligando, e di sostanza chimica in esame preparata in soluzione tamponata. Aggiungere a ciascun pozzetto 40 µl di soluzione di [^{3}H]-17β-estradiolo a 4 nM. Dopo leggera rotazione per 10-15 minuti tra 2° e 8 °C, aggiungere 40 µl di soluzione di hrERα in ciascun pozzetto. Le piastre da microtitolazione per la prova sono poste su un rotatore e incubate a 2-8 °C per 16-20 ore.

Tabella 6

Volume dei costituenti della prova di legame competitivo all'hrER, piastre da microtitolazione

Volume (µl)	Costituente
80	17β-estradiolo non marcato, noretinodrel, OTES, sostanze chimiche in esame, solvente o soluzione tamponata
40	Soluzione di [^{3}H]-17β-estradiolo a 4 nM
40	Soluzione di hrERα, concentrazione determinata dalla prova preliminare
160	***Volume totale in ciascun pozzetto di prova***

39. Il [^{3}H]-17β-estradiolo legato all'hrERα è separato dal [^{3}H]-17β-estradiolo libero aggiungendo 80 µl di sospensione fredda di DCC in ogni pozzetto, e quindi quantificato seguendo il metodo descritto nei paragrafi da 20 a 23 per la prova di legame a saturazione.

40. I pozzetti H1-H6 (indicati come «bianco (E2 caldo)» nella tabella 4) forniscono le disintegrazioni al minuto del [^{3}H]-estradiolo in 40 µl. Le aliquote di 40 µl sono versate direttamente nel liquido di scintillazione nei pozzetti da H1 a H6.

Criteri di accettabilità

Prova di legame a saturazione

41. La curva di legame specifica deve raggiungere un plateau man mano che si utilizzano concentrazioni crescenti di [^{3}H]-17β-estradiolo, il che indica la saturazione degli hrERα con il ligando.

42. Il ligando specifico di [^{3}H]-17β-estradiolo a 1 nM deve corrispondere ad una radioattività pari a 15-25 % della media della radioattività totale misurata in tutte le batteria di prove. Sono ammissibili lievi escursioni al di fuori di tale intervallo, ma se ciò avviene costantemente o se una particolare batteria di prove dà risultati significativamente al di fuori di tale intervallo, occorre adattare la concentrazione delle proteine e ripetere la prova di legame a saturazione.

43. I dati devono generare un grafico di Scatchard lineare.

44. Il legame non specifico non deve essere eccessivo: il valore è generalmente inferiore al 35 % del legame totale. Tuttavia, il rapporto può occasionalmente eccedere tale limite quando si misurano disintegrazioni per minuto molto deboli per la concentrazione testata più bassa di 17β-estradiolo radiomarcato.

Prova di legame competitivo

45. Crescenti concentrazioni di 17β-estradiolo dovrebbero spiazzare il [^{3}H]-17β-estradiolo dal recettore secondo un modello di legame competitivo in un unico sito.

46. Il valore IC_{50} per la sostanza estrogenica di riferimento (17β-estradiolo) deve essere approssimativamente uguale alla concentrazione molare di [^{3}H]-17β-estradiolo più la K_d stabilita per la prova di legame a saturazione.

47. Il legame specifico totale deve situarsi costantemente nell'intervallo di 20 ± 5 % quando la concentrazione media della radioattività totale aggiunta a ciascun pozzetto è di 1 nM in tutte le batterie di prove. Sono ammissibili lievi escursioni al di fuori di tale intervallo, ma se ciò avviene costantemente o se una particolare batteria di prove dà risultati significativamente al di fuori di tale intervallo, occorre adattare la concentrazione delle proteine.

48. Il solvente non deve alterare la sensibilità o la riproducibilità della prova. I risultati del controllo con solvente (pozzetti TB) sono confrontati con il controllo con soluzione tamponata per verificare che il solvente utilizzato non interagisca con il sistema di prova. Se il solvente non influisce sulla prova, i risultati del TB e del controllo con soluzione tamponata devono essere comparabili.

49. Il non ligando non dovrebbe spiazzare più del 25 % di [^{3}H]-17β-estradiolo dall'hrERα durante la prova a concentrazioni che vanno fino a 10^{-3} M (OTES) o 10^{-4} M (DBP).

50. Sono stati definiti criteri di prestazione per la sostanza estrogenica di riferimento e per i due ligandi deboli (ad esempio, noretinodrel, noretindrone) utilizzando i dati dello studio di validazione del saggio di legame all'hrER di FW (allegato N del riferimento 2). Vengono forniti intervalli di confidenza al 95 % per la media (n) ± SD per tutte le batterie di controllo effettuate dai laboratori che partecipano allo studio di validazione. Gli intervalli di confidenza al 95 % sono stati calcolati per i parametri di approssimazione della curva (ossia, il vertice e la base della curva, la pendenza di Hill, logIC_{50}) per la sostanza estrogenica di riferimento e i ligandi deboli e per il $\log_{10}$RBA dei ligandi deboli rispetto alla sostanza estrogenica di riferimento; tali intervalli sono forniti come criteri di prestazione per i controlli positivi. La tabella 1 fornisce gli intervalli attesi per i parametri di approssimazione della curva che possono essere utilizzati come criteri di prestazione. In pratica, l'intervallo di IC_{50} può variare leggermente in funzione della K_d della preparazione dei recettori e della concentrazione del ligando.

51. Non sono stati sviluppati criteri di prestazione per i parametri di approssimazione delle curve corrispondenti alle sostanze chimiche in esame poiché esiste una grande diversità di sostanze chimiche che possono essere potenzialmente oggetto di prova così come una grande variazione nelle affinità e risultati potenziali corrispondenti (ad es. approssimazione completa, parziale o nulla delle curve). Tuttavia, è necessario ricorrere al giudizio professionale di un esperto per analizzare i risultati di ciascuna batteria di prove su una sostanza chimica in esame. Occorre usare un intervallo di concentrazioni della sostanza chimica in esame sufficiente per definire chiaramente il vertice della curva di legame competitivo (ad es. 90-100 % di legame). La variabilità fra le repliche di ciascuna concentrazione della sostanza chimica in esame, nonché tra le tre batterie di prove non concomitanti deve essere ragionevole e giustificabile sotto il profilo scientifico. I controlli di ciascuna batteria di prove sulla sostanza in esame devono avvicinarsi alle misure di prestazione riportate per questo saggio di FW ed essere coerenti con i dati storici ottenuti per i controlli da ciascun laboratorio.

ANALISI DEI DATI

Prova di legame a saturazione

52. La prova misura il legame totale e il legame non specifico. Tali valori permettono di calcolare il legame specifico indotto da concentrazioni crescenti di [^{3}H]-17β-estradiolo in condizioni di equilibrio, sottraendo il legame non specifico dal legame totale. La curva che rappresenta il legame specifico in funzione della concentrazione di [^{3}H]-17β-estradiolo deve raggiungere un plateau per il legame specifico massimo, che indica la saturazione degli hrERα con il [^{3}H]-17β-estradiolo. Inoltre, l'analisi dei dati documenta il legame del [^{3}H]-17β-estradiolo a un unico sito di legame ad alta affinità. La curva di legame a saturazione deve indicare il legame non specifico, il legame totale e il legame specifico. Una regressione non lineare consente di approfondire l'analisi dei dati (ad es. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995), e i risultati finali sono presentati sotto forma di grafico di Scatchard.

53. L'analisi dei dati deve determinare la B_{max} e la K_d sulla base dei soli dati di legame totale, nell'ipotesi che il legame non specifico sia lineare, a meno che venga fornita una giustificazione dell'utilizzo di un altro metodo. Inoltre, si determina la migliore approssimazione delle curve mediante una solida analisi di regressione; in caso contrario se ne deve fornire la motivazione. Va indicato il metodo scelto per questa solida analisi di regressione. Una correzione relativa alla perdita di ligando (ad es. con il metodo di Swillens, 1995) va sempre applicata per determinare la B_{max} e la K_d a partire dai dati di legame a saturazione.

Prova di legame competitivo

54. Tracciare la curva di legame competitivo come legame specifico di [^{3}H]-17β-estradiolo in funzione della concentrazione (in unità $\log_{10}$) del competitore. La concentrazione della sostanza chimica in esame che inibisce il 50 % del legame massimo specifico di [^{3}H]-17β-estradiolo corrisponde al valore IC_{50}.

55. Le stime dei valori di $\log(IC_{50})$ per i controlli positivi (ad es. sostanza estrogenica di riferimento e ligando debole) sono determinate utilizzando un software di approssimazione delle curve con regressione non lineare appropriata che si basa su un'equazione di Hill a quattro parametri (ad es. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Tali approssimazioni sono effettuate senza imporre restringimenti al vertice e alla base della curva, alla pendenza e al $\log(IC_{50})$. Si determina la migliore approssimazione delle curve mediante una solida analisi di regressione; in caso contrario se ne deve fornire la motivazione. Non va applicata la correzione relativa alla perdita di ligandi. In seguito all'analisi iniziale, ciascuna curva di legame deve essere rivista per garantire la migliore approssimazione al modello. L'affinità di legame relativa (RBA) di un ligando debole è espressa in percentuale corrispondente al rapporto tra $\log(IC_{50})$ del ligando debole e il $\log(IC_{50})$ del 17β-estradiolo. I risultati dei controlli positivi e del controllo non ligando devono essere valutati in base alle misurazioni della prestazione della prova indicate nei paragrafi 45-50 della presente appendice 2.

56. I dati relativi a tutte le sostanze chimiche in esame devono essere analizzati mediante un approccio graduale per garantire un'adeguata classificazione dei dati e un'adeguata classificazione di ciascuna curva di legame competitivo. Si raccomanda che ciascuna batteria di prove per una sostanza chimica in esame sia inizialmente sottoposta a un'analisi normalizzata dei dati, identica a quella utilizzata per la sostanza estrogenica di riferimento e i controlli con ligando debole (cfr. il paragrafo 55). Una volta completata l'analisi, si procede a un esame tecnico dei parametri di approssimazione della curva e a un esame visivo per determinare in che modo i dati corrispondono alla curva di legame competitivo ottenuta per ciascuna batteria di prove. Tale esame tecnico si basa su tre osservazioni che indicano che la prova e le analisi sono state condotte correttamente: una diminuzione della percentuale di [^{3}H]-17β-estradiolo collegata ai siti specifici in funzione della concentrazione; una variabilità debole tra le repliche tecniche di ciascuna concentrazione della sostanza chimica in esame; la coerenza dei parametri di approssimazione tra le tre batterie di prove.

Interpretazione dei dati

57. A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è considerata un ligando dell'hrERα se la curva di legame può essere approssimata e se il punto più basso della curva di risposta ottenuta per l'intervallo dei dati corrisponde a un legame inferiore al 50 % (Grafico 1).

58. A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è considerata non ligando dell'hrERα se:

— la sua curva di legame può essere approssimata e se il punto più basso sulla curva di risposta approssimata ottenuta per l'intervallo di dati corrisponde a un legame superiore al 75 %, oppure

— la sua curva di legame non può essere approssimata e se la media delle percentuali di legame non livellate di tutti i gruppi di concentrazione è superiore al 75 %.

59. Le sostanze chimiche in esame sono considerate equivoche se non è soddisfatta nessuna delle condizioni di cui sopra (ad esempio il punto più basso della curva di risposta approssimata si situa tra 76 e 51 %).

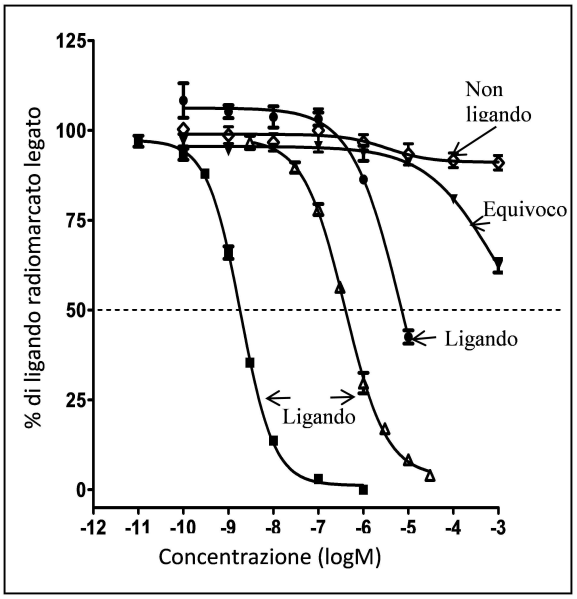
Tabella 7

Criteri di classificazione di una sostanza chimica in esame basata sulla sua curva di legame competitivo

Classificazione	Criteri
Ligando[a]	È possibile approssimare la curva di legame. Il **punto più basso della curva di risposta ottenuto per l'intervallo di dati corrisponde a un legame inferiore a 50 %.**
Non-ligando[b]	Se è possibile approssimare la curva di legame, il **punto più basso della curva di risposta approssimata ottenuto per l'intervallo di dati corrisponde a un legame superiore a 75 %.** Se non è possibile approssimare la curva di legame, sla **media delle percentuali di legame non livellate di tutti i gruppi di concentrazione della prova è superiore a 75 %.**
Equivoco[c]	Una prova valutabile che non può esser classificata come ligando né non ligando. (ad esempio il punto più basso della curva di risposta approssimata si situa tra 76 e 51 %).

Grafico 1

Esempi di classificazione della sostanza chimica in esame in base ad una curva di legame competitivo.



60. Le multiple prove condotte all'interno di un laboratorio su una sostanza chimica in esame sono combinate attribuendo valori numerici a ciascuna batteria di prove e calcolando la media di tali valori, come indicato nella tabella 8. I risultati combinati delle batterie di prove di ciascun laboratorio sono confrontati con la classificazione prevista per ciascuna sostanza chimica in esame.

Tabella 8

Metodo di classificazione della sostanza chimica in esame mediante multiple batterie di prove condotte all'interno di un laboratorio

Attribuzione di un valore a ciascuna batteria di prove:	
Classificazione	**Valore numerico**
Ligando	2
Equivoco	1
Non ligando	0
Classificazione sulla base della media dei valori numerici di tutte le batterie di prove:	
Classificazione	**Valore numerico**
Ligando	Media ≥ 1,5
Equivoco	0,5 ≤ media < 1,5
Non ligando	Media < 0,5

RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DELLA PROVA

61. Cfr. il paragrafo 24 nella sezione "**ELEMENTI DEL METODO DI PROVA DI LEGAME ALL'hrER**" del presente metodo di prova. 3

Appendice 2.1

ELENCO DEI TERMINI

[^{3}H]E2: 17β-estradiolo radiomarcato con trizio

DCC: *Dextran-coated charcoal* (carbone rivestito di destrano)

E_2: 17β-estradiolo non marcato (inerte)

Soluzione di prova tamponata: soluzione composta da 10 mM di tris, 10 mg/ml di albumina serica bovina, 2 mM di DTT, 10 % di glicerolo, 0,2 mM di leupeptina, con pH 7,5

hrERα: recettore estrogenico alfa ricombinante umano

Replica: Uno dei multipli pozzetti che contengono lo stesso contenuto alle stesse concentrazioni e che sono testati contemporaneamente in un'unica batteria di prove. Nel presente protocollo, ogni concentrazione della sostanza chimica in esame è testata in triplicato; ciò significa che tre repliche di ciascuna concentrazione della sostanza chimica in esame sono testate simultaneamente.

Batteria di prove: serie completa di prove simultanee nei pozzetti di una piastra da microtitolazione che fornisce tutte le informazioni necessarie per caratterizzare l'affinità di legame all'hrERα di una sostanza chimica in esame (ossia, quantità totale di [^{3}H]-17β-estradiolo aggiunta in un pozzetto, il legame massimo all'hrERα di [^{3}H]-17β-estradiolo, il legame non specifico e il legame totale per diverse concentrazioni della sostanza chimica in esame. Una batteria di prove può consistere anche in un unico pozzetto di prova (replica) per concentrazione, ma poiché il presente protocollo richiede prove in triplicato, una batteria di prove consiste di tre pozzetti di prova per concentrazione. Inoltre, il presente protocollo impone di realizzare tre batterie di prove indipendenti (non simultanee) per sostanza chimica.

Appendice 2.2

SAGGIO TIPICO DI SATURAZIONE CON [^{3}H]-17B-ESTRADIOLO IN TRIPLICATO

Saggio tipico di saturazione con [^{3}H]-17β-estradiolo in triplicato											
Posizione	**Replica**	**Codice per tipo di pozzetto**	**Concentrazione iniziale di E2 caldo (nM)**	**Volume di E2 caldo (µl)**	**Concentrazione finale di E2 caldo (nM)**	**Concentrazione iniziale di E2 freddo (µM)**	**Volume di E2 freddo (µl)**	**Concentrazione finale di E2 freddo (µM)**	**Volume di soluzione tamponata (µl)**	**Volume del recettore (µl)**	**Volume totale nei pozzetti**
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160

Saggio tipico di saturazione con [^{3}H]-17β-estradiolo in triplicato											
Posizione	**Replica**	**Codice per tipo di pozzetto**	**Concentrazione iniziale di E2 caldo (nM)**	**Volume di E2 caldo (µl)**	**Concentrazione finale di E2 caldo (nM)**	**Concentrazione iniziale di E2 freddo (µM)**	**Volume di E2 freddo (µl)**	**Concentrazione finale di E2 freddo (µM)**	**Volume di soluzione tamponata (µl)**	**Volume del recettore (µl)**	**Volume totale nei pozzetti**
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160

Saggio tipico di saturazione con [^{3}H]-17β-estradiolo in triplicato											
Posizione	**Replica**	**Codice per tipo di pozzetto**	**Concentrazione iniziale di E2 caldo (nM)**	**Volume di E2 caldo (µl)**	**Concentrazione finale di E2 caldo (nM)**	**Concentrazione iniziale di E2 freddo (µM)**	**Volume di E2 freddo (µl)**	**Concentrazione finale di E2 freddo (µM)**	**Volume di soluzione tamponata (µl)**	**Volume del recettore (µl)**	**Volume totale nei pozzetti**
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	caldo	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	caldo	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	caldo	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	caldo	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	caldo	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	caldo	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	caldo	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	caldo	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	caldo	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	caldo	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	caldo	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	caldo	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	caldo	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	caldo	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	caldo	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	caldo	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40

Saggio tipico di saturazione con [^{3}H]-17β-estradiolo in triplicato

Posizione	Replica	Codice per tipo di pozzetto	Concentrazione iniziale di E2 caldo (nM)	Volume di E2 caldo (µl)	Concentrazione finale di E2 caldo (nM)	Concentrazione iniziale di E2 freddo (µM)	Volume di E2 freddo (µl)	Concentrazione finale di E2 freddo (µM)	Volume di soluzione tamponata (µl)	Volume del recettore (µl)	Volume totale nei pozzetti
H5	2	caldo	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	caldo	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	caldo	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	caldo	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	caldo	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	caldo	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	caldo	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	caldo	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

N.B. I pozzetti "caldi" sono vuoti durante l'incubazione. I 40 µl che sono aggiunti successivamente servono soltanto per il conteggio per scintillazione.

Appendice 2.3

CONFIGURAZIONE DEI POZZETTI PER LA BATTERIA DI PROVE DI LEGAME COMPETITIVO

Piastra	Posizione	Replica	Tipo di pozzetto	Codice per pozzetto	Codice della concentrazione	Concentrazione iniziale del competitore (M)	Volume di hrER (µl)	Volume di soluzione tamponata (µl)	Volume di tracciante (E2 caldo) (µl)	Volume della piastra di diluizione (µl)	Volume finale (µl)	Concentrazione finale del competitore (M)
S	A1	1	legame totale	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
S	A2	2	legame totale	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
S	A3	3	legame totale	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
S	A4	1	legame totale	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
S	A5	2	legame totale	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
S	A6	3	legame totale	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
S	A7	1	E2 freddo (elevato)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	E2 freddo (elevato)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	E2 freddo (elevato)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	E2 freddo (elevato)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	E2 freddo (elevato)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	E2 freddo (elevato)	NSB	S0	2.00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	E2 freddo	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	E2 freddo	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	E2 freddo	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	E2 freddo	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B5	2	E2 freddo	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	E2 freddo	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	E2 freddo	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	E2 freddo	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	E2 freddo	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09

Piastra	Posizione	Replica	Tipo di pozzetto	Codice per pozzetto	Codice della concentrazione	Concentrazione iniziale del competitore (M)	Volume di hrER (µl)	Volume di soluzione tamponata (µl)	Volume di tracciante (E2 caldo) (µl)	Volume della piastra di diluizione (µl)	Volume finale (µl)	Concentrazione finale del competitore (M)
S	B10	1	E2 freddo	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	E2 freddo	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	E2 freddo	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	E2 freddo	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	E2 freddo	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	E2 freddo	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	E2 freddo	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	E2 freddo	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	E2 freddo	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	E2 freddo	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	E2 freddo	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C9	3	E2 freddo	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	bianco	bianco	B1	—	—	160	—	—	160	—
S	C11	2	bianco	bianco	B2	—	—	160	—	—	160	—
S	C12	3	bianco	bianco	B3	—	—	160	—	—	160	—
S	D1	1	Noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	Noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	Noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	Noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	Noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	Noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05

Piastra	Posizione	Replica	Tipo di pozzetto	Codice per pozzetto	Codice della concentrazione	Concentrazione iniziale del competitore (M)	Volume di hrER (µl)	Volume di soluzione tamponata (µl)	Volume di tracciante (E2 caldo) (µl)	Volume della piastra di diluizione (µl)	Volume finale (µl)	Concentrazione finale del competitore (M)
S	D7	1	Noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	Noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	Noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	Noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	Noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	Noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	E1	1	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	Noretinodrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	Noretinodrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	Noretinodrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E8	2	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09

Piastra	Posizione	Replica	Tipo di pozzetto	Codice per pozzetto	Codice della concentrazione	Concentrazione iniziale del competitore (M)	Volume di hrER (µl)	Volume di soluzione tamponata (µl)	Volume di tracciante (E2 caldo) (µl)	Volume della piastra di diluizione (µl)	Volume finale (µl)	Concentrazione finale del competitore (M)
S	E11	2	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G6	3	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09

Piastra	Posizione	Replica	Tipo di pozzetto	Codice per pozzetto	Codice della concentrazione	Concentrazione iniziale del competitore (M)	Volume di hrER (µl)	Volume di soluzione tamponata (µl)	Volume di tracciante (E2 caldo) (µl)	Volume della piastra di diluizione (µl)	Volume finale (µl)	Concentrazione finale del competitore (M)
S	G8	2	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	H1	1	caldo	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H2	1	caldo	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H3	1	caldo	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H4	1	caldo	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H5	1	caldo	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H6	1	caldo	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H7	1	Ctrl con tampone	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H8	1	Ctrl con tampone	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H9	1	Ctrl con tampone	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H10	1	Ctrl con tampone	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H11	1	Ctrl con tampone	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H12	1	Ctrl con tampone	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—

N.B. I pozzetti "caldi" sono vuoti durante l'incubazione. I 40 µl che sono aggiunti successivamente servono soltanto per il conteggio per scintillazione.

Configurazione dei pozzetti per la batteria di prove di legame competitivo

Piastra	Posizione	Replica	Tipo di pozzetto	Codice del pozzetto	Codice della concentrazione	Concentrazione iniziale del competitore (M)	Volume di hrER (µl)	Volume di soluzione tamponata (µl)	Volume di tracciante (E2 caldo) (µl)	Volume della piastra di diluizione µl)	Volume finale (µl)	Concentrazione finale del competitore (M)
P1	A1	1	legame totale	TB	TBB1B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	legame totale	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	legame totale	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	legame totale	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	legame totale	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	legame totale	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	E2 freddo (elevato)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	E2 freddo (elevato)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	E2 freddo (elevato)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	E2 freddo (elevato)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	E2 freddo (elevato)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A12	3	E2 freddo (elevato)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	Sost. in esame 1	TC1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B2	2	Sost. in esame 1	TC1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B3	3	Sost. in esame 1	TC1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B4	1	Sost. in esame 1	TC1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B5	2	Sost. in esame 1	TC1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B6	3	Sost. in esame 1	TC1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B7	1	Sost. in esame 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	Sost. in esame 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	Sost. in esame 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	Sost. in esame 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	Sost. in esame 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	Sost. in esame 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Configurazione dei pozzetti per la batteria di prove di legame competitivo

Piastra	Posizione	Replica	Tipo di pozzetto	Codice del pozzetto	Codice della concentrazione	Concentrazione iniziale del competitore (M)	Volume di hrER (µl)	Volume di soluzione tamponata (µl)	Volume di tracciante (E2 caldo) (µl)	Volume della piastra di diluizione µl)	Volume finale (µl)	Concentrazione finale del competitore (M)
P1	C1	1	Sost. in esame 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	Sost. in esame 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	Sost. in esame 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	Sost. in esame 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	Sost. in esame 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	Sost. in esame 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	Sost. in esame 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	Sost. in esame 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	Sost. in esame 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	Sost. in esame 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	Sost. in esame 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	Sost. in esame 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	Sost. in esame 2	TC2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D2	2	Sost. in esame 2	TC2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D3	3	Sost. in esame 2	TC2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D4	1	Sost. in esame 2	TC2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D5	2	Sost. in esame 2	TC2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D6	3	Sost. in esame 2	TC2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D7	1	Sost. in esame 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	Sost. in esame 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	Sost. in esame 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	Sost. in esame 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	Sost. in esame 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	Sost. in esame 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Configurazione dei pozzetti per la batteria di prove di legame competitivo

Piastra	Posizione	Replica	Tipo di pozzetto	Codice del pozzetto	Codice della concentrazione	Concentrazione iniziale del competitore (M)	Volume di hrER (µl)	Volume di soluzione tamponata (µl)	Volume di tracciante (E2 caldo) (µl)	Volume della piastra di diluizione µl)	Volume finale (µl)	Concentrazione finale del competitore (M)
P1	E1	1	Sost. in esame 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	Sost. in esame 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	Sost. in esame 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E4	1	Sost. in esame 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	Sost. in esame 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	Sost. in esame 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	Sost. in esame 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	Sost. in esame 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	Sost. in esame 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	Sost. in esame 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	Sost. in esame 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	Sost. in esame 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	Sost. in esame 3	TC3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F2	2	Sost. in esame 3	TC3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F3	3	Sost. in esame 3	TC3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F4	1	Sost. in esame 3	TC3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F5	2	Sost. in esame 3	TC3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F6	3	Sost. in esame 3	TC3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F7	1	Sost. in esame 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	Sost. in esame 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	Sost. in esame 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	Sost. in esame 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	Sost. in esame 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	Sost. in esame 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Configurazione dei pozzetti per la batteria di prove di legame competitivo

Piastra	Posizione	Replica	Tipo di pozzetto	Codice del pozzetto	Codice della concentrazione	Concentrazione iniziale del competitore (M)	Volume di hrER (µl)	Volume di soluzione tamponata (µl)	Volume di tracciante (E2 caldo) (µl)	Volume della piastra di diluizione µl)	Volume finale (µl)	Concentrazione finale del competitore (M)
P1	G1	1	Sost. in esame 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	Sost. in esame 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	Sost. in esame 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	Sost. in esame 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	Sost. in esame 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	Sost. in esame 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	Sost. in esame 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	Sost. in esame 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	Sost. in esame 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	Sost. in esame 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	Sost. in esame 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	Sost. in esame 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	Noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	Noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	Noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	Noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	Noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	Noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	E2 freddo S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	E2 freddo S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	E2 freddo S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	E2 freddo S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	E2 freddo S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	E2 freddo S			1,00E-7	40	0	40	80	160	

Appendice 3

METODO DI PROVA IN VITRO DI LEGAME AL RECETTORE ESTROGENICO (ER) BASATO SULLA PROTEINA DEL DOMINIO DI LEGAME DEL LIGANDO DELL'ERA RICOMBINANTE UMANO SECONDO IL METODO DEL CERI (*CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE*)

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI (CFR. ANCHE INTRODUZIONE GENERALE)

1. Questo metodo di prova *in vitro* di legame a saturazione e di legame competitivo al recettore estrogenico (ERα) utilizza il dominio di legame del ligando (LBD) del recettore estrogenico α umano (hrERα). Questo costrutto proteico è stato realizzato dal *Chemical Evaluation and Research Institute* (CERI, Giappone) ed esiste sotto forma di proteina di fusione glutatione-S-transferasi (GST), espressa in *E. coli*. Il protocollo sviluppato dal CERI è stato sottoposto a uno studio internazionale di validazione realizzato da diversi laboratori (2) che ha dimostrato la pertinenza e l'affidabilità di questo metodo di prova per gli scopi previsti.

2. Il presente metodo di prova costituisce una procedura di screening intesa ad individuare le sostanze che possono legarsi all'hrERα. Esso permette di determinare la capacità di una sostanza chimica in esame di competere con il 17β-estradiolo nel formare legami con il dominio di legame del ligando dell'hrERα. I risultati sotto il profilo quantitativo possono comprendere il valore IC_{50} (la concentrazione della sostanza chimica in esame necessaria per spiazzare la metà del [^{3}H]-17β-estradiolo legato all'hrERα) e le affinità di legame relative delle sostanze chimiche in esame per l'hrERα rispetto al 17β-estradiolo. Ai fini dello screening chimico, i risultati accettabili sotto il profilo qualitativo possono comprendere la classificazione delle sostanze chimiche in esame come ligandi o non ligandi dell'hrERα, oppure generanti una risposta equivoca, in funzione dei criteri descritti per le curve di legame.

3. Atteso che il metodo di prova utilizza un ligando radioattivo, il laboratorio deve richiedere una licenza per trattare materiali radioattivi. Tutte le procedure che implicano radioisotopi e sostanze chimiche pericolose devono essere conformi ai regolamenti e alle procedure stabiliti dalla legislazione nazionale.

4. Le sezioni "**INTRODUZIONE GENERALE**" e "**COMPONENTI DEL METODO DI PROVA DI LEGAME ALL'-hrER**" vanno lette prima di applicare il presente metodo di prova per fini regolamentari. Le definizioni e le abbreviazioni utilizzate nella presente linea guida figurano nell'appendice 1.

PRINCIPI DEL METODO DI PROVA (CFR. ANCHE INTRODUZIONE GENERALE)

5. La prova di legame (hrERα) consiste principalmente nel misurare la capacità di un ligando radiomarcato ([^{3}H]-17β-estradiolo) a legarsi agli ER in presenza di concentrazioni crescenti di una sostanza chimica in esame (denominata "competitore"). Le sostanze chimiche in esame che presentano un'alta affinità di legame agli ER competono con il ligando radiomarcato a una concentrazione inferiore rispetto alle sostanze chimiche che hanno una più debole affinità per il recettore.

6. Il presente metodo di prova consta di due componenti principali: un esperimento di legame a saturazione per caratterizzare i parametri di interazione recettore-ligando, seguito da un esperimento di legame competitivo per determinare in che misura una sostanza chimica in esame compete con un ligando radiomarcato per legarsi agli ER.

7. Scopo dell'esperimento di legame a saturazione è caratterizzare il numero e l'affinità di legame dei recettori di un particolare lotto in vista dell'esperimento di legame competitivo. L'esperimento di legame a saturazione misura, in condizioni di equilibrio, l'affinità di una concentrazione fissa di recettori degli estrogeni rispetto al loro ligando naturale (rappresentata dalla costante di dissociazione, K_d) e la concentrazione di siti recettori attivi (B_{max}).

8. L'esperimento di legame competitivo misura l'affinità di una sostanza a legarsi agli ER in competizione con il [^{3}H]-17β-estradiolo. L'affinità è quantificata dalla concentrazione della sostanza in esame che, in condizioni di equilibrio, inibisce il 50 % del legame specifico del [^{3}H]-17β-estradiolo (definita «concentrazione che induce un'inibizione del 50 %» o «IC_{50}»). Essa si può esprimere anche come l'affinità di legame relativa (RBA, calcolata in rapporto all'IC_{50} di estradiolo misurata separatamente nell'ambito della stessa batteria di prove). L'esperimento di legame competitivo misura il legame di [^{3}H]-17β-estradiolo a una concentrazione fissa in presenza di un ampio intervallo (otto ordini di grandezza) di concentrazioni della sostanza chimica in esame. I dati sono quindi approssimati, ove possibile, a una forma dell'equazione di Hill (Hill, 1910) che descrive lo spiazzamento del ligando radiomarcato da parte di un ligando competitore su un sito unico. L'ampiezza dello spiazzamento dell'estradiolo radiomarcato, in condizioni di equilibrio, è utilizzata per caratterizzare la sostanza chimica in esame come ligando, non ligando o generante una risposta equivoca.

PROCEDURA

Dimostrazione dell'accettabilità della prestazione della proteina hrERα

9. Prima di effettuare le prove di routine relative al legame competitivo e al legame a saturazione, si deve verificare che ciascun lotto di hrERα stia funzionando correttamente nel laboratorio in cui sarà utilizzato. Un processo in due fasi è applicato per dimostrare tale prestazione. Le due fasi in questione consistono in:
   — una prova di legame a saturazione [^{3}H]-17β-estradiolo per dimostrare la specificità e la saturazione dell'hrERα. Un'analisi di regressione non lineare dei dati ottenuti (ad es. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) e il grafico di Scatchard così ottenuto documenteranno l'affinità di legame del [^{3}H]-17β-estradiolo (K_d) e il numero di recettori (B_{max}) per un determinato lotto di hrERα.
   — una prova di legame competitivo utilizzando le sostanze di controllo (sostanza estrogenica di riferimento 17β-estradiolo), un ligando debole (ad esempio, noretinodrel o noretindrone) e un non ligando (ottiltrietossisilano, OTES). Ciascun laboratorio è tenuto a creare una banca di dati storici per documentare che l'IC_{50} e i valori pertinenti per la sostanza estrogenica di riferimento e un ligando debole rimangono coerenti tra una prova e l'altra e tra i diversi lotti di hrERα. Inoltre, i parametri delle curve di legame competitivo per le sostanze di controllo dovrebbero rientrare nei limiti dell'intervallo di confidenza del 95 % (cfr. la tabella 1) sviluppati utilizzando i dati dei laboratori che hanno partecipato allo studio di validazione della prova (2).

Tabella 1

Criteri di prestazione definiti per la sostanza estrogenica di riferimento e il ligando debole nella prova di legame all'hrER del CERI.

Sostanza	Parametro	Media [a]	Deviazione standard (n)	Intervallo di confidenza al 95 % [b]	
				Limite inferiore	Limite superiore
17β-estradiolo	Vertice	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Base	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Pendenza di Hill	−1,22	0,20 (70)	−1,27	−1,17
	$LogIC_{50}$	−8,93	0,23 (70)	−8,98	−8,87
Noretinodrel	Vertice	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Base	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Pendenza di Hill	−1,04	0,21 (68)	−1,09	−0,99
	$LogIC_{50}$	−6,19	0,40 (68)	−6,29	−6,10
Noretindrone [c]	Vertice	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Base	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Pendenza di Hill	−1,18	0,32 (23)	−1,31	−1,04
	$LogIC_{50}$	−6,01	0,54 (23)	−6,25	−5,78

[a] I valori medi ± deviazione standard (SD) per il campione di dimensione (n) sono stati calcolati utilizzando le stime dei parametri di approssimazione delle curve (equazione di Hill a 4 parametri) per le batterie di prove di controllo condotte in quattro laboratori durante lo studio di validazione (cfr. l'allegato N del riferimento 2).

[b] Gli intervalli di confidenza al 95 % sono forniti a titolo di orientamento per i criteri di accettabilità.

[c] La sperimentazione sul noretindrone era facoltativo per la fase 4 dello studio di validazione (cfr. riferimento 2, Subtask 4). Pertanto, i valori medi ± SD (n) sono stati calcolati utilizzando le stime dei parametri di approssimazione delle curve (equazione di Hill a 4 parametri) per i controlli effettuati in due laboratori.
L'intervallo per l'IC_{50} dipenderà dalla K_d della preparazione dei recettori e dalla concentrazione del ligando radiomarcato utilizzata in ciascun laboratorio. È consentito effettuare le idonee approssimazioni per l'intervallo di IC_{50} in funzione delle condizioni di conduzione della prova.

Dimostrazione delle competenze del laboratorio

10. Cfr. i paragrafi 17 e 18 e la Tabella 2 nella sezione **"ELEMENTI DEL METODO DI PROVA DI LEGAME ALL'hrER"** del presente metodo di prova. Ciascuna prova (di legame a saturazione e di legame competitivo) deve consistere in tre batterie indipendenti di prove (ossia con nuove diluizioni di recettore, sostanze chimiche e reagente) condotte in giorni differenti, e ciascuna batteria di prove deve comportare tre repliche.

Determinazione della concentrazione di recettore (hrERα)

11. La concentrazione di recettori attivi varia leggermente in funzione del lotto e delle condizioni di conservazione. Per questo motivo, occorre determinare la concentrazione di recettori attivi del lotto ricevuto dal fornitore. Questa fase permette di ottenere la concentrazione esatta di recettori attivi al momento della prova.

12. Alle stesse condizioni della prova di legame competitivo (ossia, 0,5 nM [^{3}H]-estradiolo), le concentrazioni nominali di 0,1, 0,2 0,4 e 0,6 nM di recettore sono incubate in assenza (legame totale) e in presenza (legame non specifico) di estradiolo non marcato a 1 μM. Il legame specifico, calcolato come differenza tra il legame totale e il legame non specifico, è rappresentato graficamente in funzione della concentrazione nominale di recettore. La concentrazione di recettore che fornisce valori di legame specifici corrispondenti al 40 % del ligando radiomarcato aggiunto è correlata alla corrispondente concentrazione di recettore; quest'ultima è utilizzata per esperimenti di legame a saturazione e di legame competitivo. Frequentemente, tale condizione è soddisfatta da una concentrazione finale di hrER di 0,2 nM.

13. Se il criterio del 40 % fallisce ripetutamente, occorre verificare l'impianto sperimentale per individuare eventuali errori. Il mancato raggiungimento del criterio del 40 % può indicare che il lotto di recettori ricombinanti contiene pochissimi siti attivi; occorre quindi considerare il ricorso a un altro lotto di recettori.

Prova a saturazione

14. Sono valutate otto concentrazioni crescenti di [^{3}H]-17β-estradiolo in triplicato, rispettando le tre condizioni seguenti (cfr. tabella 2):

    a. In assenza di 17β-estradiolo non marcato e in presenza di ER. Questa condizione permette di determinare il legame totale misurando la radioattività nei pozzetti che contengono soltanto [^{3}H]-17β-estradiolo.

    b. In presenza di una concentrazione di 17β-estradiolo non marcato 2000 volte superiore a quella di 17β-estradiolo marcato e in presenza di ER. Questa condizione è intesa a saturare i siti di legame attivi con 17β-estradiolo non marcato e a determinare il legame non specifico misurando la radioattività presente nei pozzetti. Si considera che l'estradiolo caldo (radiomarcato) eventualmente rimanente capace di legarsi al recettore si leghi a un sito non specifico, in quanto l'estradiolo freddo (non marcato) deve essere in concentrazione talmente elevata da legarsi a tutti i siti specifici disponibili sul recettore.

    c. In assenza di 17β-estradiolo non marcato e in assenza di ER (determinazione della radioattività totale).

Preparazione delle soluzioni di [^{3}H]-17β-estradiolo, di 17β-estradiolo non marcato e di hrERα.

15. Preparare una soluzione di 40 nM di [^{3}H]-17β-estradiolo a partire da una soluzione madre di 1 μM di [^{3}H]-17β-estradiolo nel DMSO, aggiungendo il DMSO (per preparare 200 nM) e la soluzione tamponata di prova a temperatura ambiente (prepararne 40 nM). Tale soluzione di 40 nM è quindi diluita con la soluzione tamponata a temperatura ambiente per preparare la serie di diluizioni di [^{3}H]-17β-estradiolo, che vanno da 0,313 nM a 40 nM (conformemente alla colonna 12 della tabella 2). Le concentrazioni di prova finali, da 0,0313 a 4,0 nM, si ottengono aggiungendo 10 μl di tali soluzioni nei rispettivi pozzetti di prova di una piastra da microtitolazione a 96 pozzetti (cfr. tabelle 2 e 3). La preparazione della soluzione tamponata, la caratterizzazione della soluzione madre di [^{3}H]-17β-estradiolo a partire dalla sua attività specifica, la preparazione delle diluizioni e la determinazione delle concentrazioni sono descritte in dettaglio nel protocollo del CERI (2).

16. Le diluizioni delle soluzioni di 17β-estradiolo non marcato sono preparate aggiungendo la soluzione tamponata alla soluzione madre di 17β-estradiolo a 1 nM in modo da ottenere otto concentrazioni crescenti che inizialmente vanno da 0,625 µM a 80 µM. Le concentrazioni di prova finali, da 0,0625 a 8 µM, si ottengono aggiungendo 10 µl di tali soluzioni nei rispettivi pozzetti di prova di una piastra da microtitolazione a 96 pozzetti che serve per misurare il legame non specifico (cfr. tabelle 2 e 3). La preparazione di diluizioni di 17β-estradiolo non marcato è descritto in dettaglio nel protocollo del CERI (2).

17. Occorre utilizzare la concentrazione di recettore che produce un legame specifico di 40 ± 10 % (cfr. i paragrafi 12 e 13). La soluzione di hrERα è preparata con soluzione di prova tamponata ghiacciata immediatamente prima della prova, cioè quando sono stati preparati tutti i pozzetti che servono per determinare il legame totale, il legame non specifico e quelli che contengono solo il ligando caldo.

18. Le piastre da microtitolazione a 96 pozzetti sono preparate come illustrato nella tabella 2, con 3 repliche per concentrazione di [^{3}H]-17β-estradiolo. La ripartizione dei volumi di [^{3}H]-17β-estradiolo, di 17β-estradiolo non marcato, di soluzione tampone e di recettore figurano nella tabella 3.

Tabella 2

Configurazione della piastra da microtitolazione nella prova di legame a saturazione

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	Per misurare il TB			Per misurare il NSB			Per misurare il ligando caldo solo				Diluizioni di E2 non marcate per le colonne 4-6 della piastra	Diluizioni di [^{3}H]E2 non marcate per le colonne 1-9 della piastra
A	0,0313 nM [^{3}H]E2+ ER			0,0313 nM [3H]E2+ 0,0625 µM E2+ ER			0,0313 nM				0,625 µM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3}H]E2+ ER			0,0625 nM [3H]E2+ 0,125 µM E2+ ER			0,0625 nM				1,25 µM	0,625 nM
C	0,125 nM [^{3}H]E2+ ER			0,125 nM [3H]E2+ 0,25 µM E2+ ER			0,125 nM				2,5 µM	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3}H]E2+ ER			0,250 nM [3H]E2+ 0,5 µM E2+ ER			0,250 nM				5 µM	2,5 nM
E	0,50 nM [^{3}H] E2+ ER			0,50 nM [3H]E2+ 1 µM E2+ ER			0,50 nM				10 µM	5 nM
F	1,00 nM [^{3}H]E2+ ER			1,00 nM [3H]E2+ 2 µM E2+ ER			1,00 nM				20 µM	10 nM
G	2,00 nM [^{3}H]E2+ ER			2,00 nM [3H]E2+ 4 µM E2+ ER			2,00 nM				40 µM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H]E2+ ER			4,00 nM [3H]E2+ 8 µM E2+ ER			4,00 nM				80 µM	40 nM

TB: legame totale.
NSB: legame non specifico.
[^{3}H] E_2: [^{3}H]-17β-estradiolo
E2: 17β-estradiolo non marcato
(*) Le concentrazioni indicate qui sono le concentrazioni finali in ciascun pozzetto.
(**) Le diluizioni di E2 non marcato e di [^{3}H]E2 possono essere preparate su un'altra piastra.

Tabella 3

Volumi di reagente nella piastra da microtitolazione nella prova di legame a saturazione

Numero di colonna		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Fasi della preparazione		Pozzetti TB			Pozzetti NSB			Solo ligando caldo		
Volume dei componenti da versare nei pozzetti di prova, e ordine dell'aggiunta	Soluzione tampone	60 µl			50 µl			90 µl		
	E2 non marcato della colonna 11 nella tabella 2	–			10 µl			–		
	[^{3}H]E2 dalla colonna 12 nella tabella 2	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			–		
Volume di reazione totale		100 µl			100 µl			100 µl		
Incubazione		**DOPO 2 ORE DI REAZIONE PER INCUBAZIONE**						Quantificazione della radioattività immediatamente dopo la preparazione. Nessuna incubazione		
Aggiunta di DCC a 0,4 %		**Sì**			**Sì**			**No**		
Volume di DCC a 0,4 %		100 µl			100 µl			–		
Filtrazione		Sì			Sì			No		
MISURAZIONE DELLE DPM										
Volume di quantificazione aggiunto al cocktail di scintillazione		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Se si utilizza un contatore a scintillazione per piastra da microtitolazione per misurare le disintegrazioni per minuto, il ligando caldo solo non può essere preparato sulla stessa piastra dei pozzetti che servono per determinare il TB e il NSB. Il ligando caldo solo deve quindi essere preparato in una piastra separata.

(**) Se il DCC è separato per centrifugazione, i 50 µl di supernatante devono essere misurati mediante conteggio per scintillazione liquida (LSC) al fine di evitare la contaminazione con il DCC.

19. Le piastre da microtitolazione per la determinazione del legame totale e del legame non specifico devono essere poste in incubazione per due ore a temperatura ambiente (da 22 °C a 28 °C).

Misurazione del [^{3}H]-17β-estradiolo legato all'hrERα

20. Dopo le due ore di incubazione, il [^{3}H]-17β-estradiolo legato al hrERα è preparato dal [^{3}H]-17β-estradiolo libero con l'aggiunta di 100 µl di una sospensione ghiacciata di DCC a 0,4 % in ciascun pozzetto. Mettere le piastre in ghiaccio per 10 minuti e filtrare la miscela di reazione e la sospensione di DCC mediante filtro per piastra di microtitolazione al fine di rimuovere il DCC. Aggiungere quindi 100 µl del filtrato al liquido di scintillazione nelle fiale per LSC per determinare le disintegrazioni al minuto (DPM) di ciascuna fiala mediante conteggio per scintillazione liquida.

21. In alternativa, se non è disponibile un filtro per piastra da microtitolazione, la rimozione del DCC può essere effettuata mediante centrifugazione. Un volume di 50 µl del supernatante contenente il [^{3}H]-17β-estradiolo legato all'hrERα è quindi prelevato con estrema cura, in modo da evitare qualsiasi contaminazione dei pozzetti per contatto con il DCC, ed è quindi sottoposto a conteggio per scintillazione.

22. Il ligando caldo solo permette di determinare le disintegrazioni al minuto (dpm) del [^{3}H]-17β-estradiolo aggiunto ai pozzetti di prova. La radioattività è quantificata immediatamente dopo la preparazione. Questi pozzetti non sono incubati e on sono trattati con la sospensione di DCC, e il loro contenuto è trasferito direttamente nel liquido di scintillazione. Queste misurazioni indicano la quantità di [^{3}H]-17β-estradiolo (espressa in dpm) aggiunta a ciascuna serie di pozzetti per il legame totale e il legame non specifico.

Prova di legame competitivo

23. La prova di legame competitivo misura i legami di [^{3}H]-17β-estradiolo in concentrazione fissa in presenza di concentrazioni crescenti della sostanza chimica in esame. Per ciascuna concentrazione si dovranno utilizzare tre repliche concomitanti nella stessa batteria di prove. Inoltre, per ogni sostanza chimica sottoposta a prova devono essere effettuate tre batterie di prove non concomitanti. La prova richiede una o più piastre da microtitolazione a 96 pozzetti.

Controlli

24. Durante l'esecuzione della prova vanno inclusi in ciascun esperimento il solvente e i controlli concomitanti (ossia, la sostanza estrogenica di riferimento, ligando debole e non ligandi). Per ciascuna batteria di prove, una medesima piastra deve essere utilizzata per stabilire le curve di tutte le concentrazioni della sostanza estrogenica di riferimento e dei controlli (ossia, ligando debole e non ligando). Tutte le altre piastre devono contenere: i) una concentrazione elevata (massimo spiazzamento, ossia circa la piena sostituzione del ligando radiomarcato) e media (corrispondente circa alla IC_{50}) di E2 e un ligando debole in triplicato; 2) i controlli con solvente e ligandi non specifici, ciascuno in triplicato. Le procedure per la preparazione della soluzione tamponata, del [^{3}H]-17β-estradiolo, dell'hrERα e delle soluzioni della sostanza chimica in esame sono descritte in dettaglio nel protocollo del CERI (2).

Controllo con solvente:

25. Il controllo trattato solo con il solvente conferma che il solvente non interagisce con il sistema di prova e permette di misurare il legame totale (TB). Di preferenza si utilizzerà il DMSO come solvente. In alternativa, se la concentrazione massima della sostanza chimica in esame non è solubile in DMSO, si può usare l'etanolo. La concentrazione del DMSO nei pozzetti a fine prova deve essere pari al 2,05 %, ma potrebbe essere aumentata fino al 2,5 % se la sostanza chimica in esame non è sufficientemente solubile. Le concentrazioni di DMSO superiori al 2,5 % non devono essere utilizzate perché concentrazioni più elevate di solvente interferiscono con la prova. Per le sostanze chimiche in esame che non sono solubili nel DMSO, ma solubili in etanolo, è possibile utilizzare fino al 2 % di etanolo nella prova senza che si generi interferenza.

Controllo con soluzione tamponata:

26. Il controllo con soluzione tamponata contiene tutti gli altri elementi della prova, tranne il solvente e la sostanza chimica in esame. I risultati del controllo con soluzione tamponata sono confrontati con il controllo con solvente per verificare che il solvente utilizzato non interferisca con il sistema di prova.

Ligando forte (sostanza estrogenica di riferimento)

27. Il 17β-estradiolo (CAS 50-28-2) è il ligando endogeno che presenta una forte affinità di legame all'ER di tipo alfa. Si rappresenti una curva standard utilizzando il 17β-estradiolo non marcato per ciascuna prova di legame competitivo all'hrERα, al fine di valutare la variabilità delle prove condotte nel corso del tempo nello stesso laboratorio. Otto soluzioni di 17β-estradiolo non marcato sono preparate nel DMSO e nella soluzione tamponata, al fine di ottenere le seguenti concentrazioni finali nei pozzetti di prova: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8.5}$, 10^{-9}, $10^{-9.5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. La concentrazione più alta di 17β–estradiolo non marcato (1 μM) funge da indicatore di legame non specifico. Tale concentrazione è distinta dall'indicazione «NSB» nella tabella 4, sebbene faccia parte anche della curva standard.

Ligando debole

28. Per dimostrare la sensibilità di ogni esperimento e consentire una valutazione della variabilità delle prove condotte nel corso del tempo, viene incluso un ligando debole (noretinodrel (CAS68-23-5) o, in alternativa, noretindrone (CAS 68-22-4). Otto soluzioni di ligando debole sono preparate nel DMSO e nella soluzione tamponata, al fine di ottenere le seguenti concentrazioni finali nei pozzetti di prova: $10^{-4.5}$, $10^{-5.5}$, 10^{-6}, $10^{-6.5}$, 10^{-7}, $10^{-7.5}$, 10^{-8} and 10^{-9} M.

Non ligando

29. Si utilizzerà l'ottiltrietossisilano (OTES, CAS 2943-75-1) come controllo negativo (non ligando). Ciò consente di verificare che la conduzione della prova individuerà le sostanze chimiche in esame che non si legano all'hrERα. Otto soluzioni di non ligando sono preparate nel DMSO e nella soluzione tamponata, al fine di ottenere le seguenti concentrazioni finali nei pozzetti di prova: 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Si può utilizzare anche lo ftalato di di–n–butile (DBP, CAS 84-72-2) come non ligando alternativo, ma limitando la concentrazione massima analizzata a 10^{-4}M. Infatti, è stato dimostrato che la solubilità massima del DBP nella prova è pari a 10^{-4} M.

Concentrazione di hrERα

30. Occorre utilizzare la quantità di recettore che produce un legame specifico di 40 ± 10 % (cfr. i paragrafi 12 e 13 dell'allegato 3). La soluzione di hrERα è preparata immediatamente prima della prova mediante diluizione dell'hrERα funzionale in soluzione di prova tamponata ghiacciata.

[^{3}H]-17β-estradiolo

31. La concentrazione finale di [^{3}H]-17β-estradiolo nei pozzetti di prova deve essere di 0,5 nM.

Sostanze chimiche in esame

32. Occorre effettuare una prova preliminare per determinare il limite di solubilità di ciascuna sostanza chimica in esame e per identificare l'intervallo delle concentrazioni appropriato da utilizzare durante l'esecuzione del protocollo sperimentale. Il limite di solubilità di ciascuna sostanza chimica in esame deve essere inizialmente determinato nel solvente e quindi ulteriormente confermato alle condizioni sperimentali. La concentrazione finale utilizzata nella prova non deve essere superiore a 1 mM. La prova per determinare l'intervallo delle concentrazioni (*range finding test*) consiste in un controllo con solvente più una serie logaritmica di 8 diluizioni della concentrazione massima (ad es. 1 mM o meno, secondo il limite di solubilità). Si noterà l'apparizione di torbidità o precipitato (cfr. anche paragrafo 35 dell'appendice 3). Una volta determinato l'intervallo di concentrazioni per la prova, una sostanza chimica in esame deve essere testata utilizzando 8 concentrazioni in serie logaritmica spaziate opportunamente, come definito nella precedente prova d'individuazione dell'intervallo. Se necessario, le concentrazioni testate nella seconda e nella terza prova devono essere ulteriormente adattate in modo da caratterizzare meglio la curva concentrazione-risposta.

33. Le diluizioni della sostanza chimica in esame vanno preparate nel solvente appropriato (cfr. il paragrafo 25 dell'appendice 3). Se la concentrazione più elevata della sostanza chimica in esame non è solubile in DMSO o in etanolo e se aggiungendo più solvente la concentrazione del solvente nei pozzetti al termine della prova risulta superiore al limite accettabile, la concentrazione più elevata può essere ridotta alla concentrazione immediatamente inferiore. In tal caso, è possibile aggiungere una concentrazione supplementare all'inizio della serie di concentrazioni. Le altre concentrazioni della serie rimangono invariate.

34. I pozzetti di prova sono monitorati attentamente durante l'aggiunta delle soluzioni della sostanza chimica in esame, in quanto tale aggiunta può provocare un precipitato. I dati relativi a tutti i pozzetti che contengono precipitato vanno esclusi dall'approssimazione della curva e la ragione di esclusione dei dati va riportata.

35. Se esistono informazioni precedenti provenienti da altre fonti che forniscono dati sul $\log(IC_{50})$ di una sostanza chimica in esame, può essere opportuno ripartire geometricamente le diluizioni in modo più ravvicinato attorno al $\log(IC_{50})$ atteso (ossia, 0,5 unità logaritmiche). I risultati finali devono corrispondere a un intervallo di concentrazioni sufficientemente ripartite ai due lati del $\log(IC_{50})$, compresi il vertice (*top*) e la base (*bottom*) della curva di legame, al fine di caratterizzarla in modo adeguato.

Configurazione della piastra di prova

36. Le piastre di microtitolazione sono preparate usando serie di sei repliche incubate distinte per il controllo con solvente, alla concentrazione più elevata della sostanza estrogenica di riferimento (E2) che serve anche come indicatore di legame non specifico (NSB), il controllo della soluzione tamponata, incubazioni in triplicato per ciascuna delle otto concentrazioni del controllo non ligando (ottiltrietossisilano), le sette concentrazioni inferiori della sostanza estrogenica di riferimento (E2), le otto concentrazioni del ligando debole (noretinodrel o noretindrone) e le otto concentrazioni di ciascuna sostanza chimica in esame (TC). Un esempio di configurazione delle piastre per ottenere curve complete a partire da tutte le concentrazioni della sostanza estrogenica di riferimento e i controlli è riportato nella tabella 4. Si utilizzano piastre di microtitolazione aggiuntive per la sostanza chimica in esame contenenti: i) una concentrazione elevata (massimo spiazzamento) e media (circa IC_{50}) di E2 e del ligando debole in triplicato; ii) il controllo con solvente (come legame totale) e legame non specifico, ciascuno in sei replicati (tabella 5). Nell'appendice 3.3 è riportato un esempio di configurazione della piastra da microtitolazione per la prova di legame competitivo di tre sostanze sconosciute. Le concentrazioni indicate nel foglio di lavoro, così come nelle tabelle 4 e 5, si riferiscono alle concentrazioni finali utilizzate in ciascun pozzetto di prova. La concentrazione massima di E2 deve essere pari a 1×10^{-7} M mentre, per il ligando debole, è utilizzata la concentrazione più elevata della piastra 1. La concentrazione IC_{50} è determinata dal laboratorio a partire della sua banca dei dati storici. Si prevede che questo valore sarà analogo a quello osservato negli studi di validazione (cfr. tabella 1).

Tabella 4

Configurazione della piastra da microtitolazione per la prova di legame competitivo [1] [2]**, curve concentrazione-risposta complete per la sostanza estrogenica di riferimento e i controlli (piastra 1).**

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Controllo con soluzione tamponata e controllo positivo (E2)			Controllo debolmente positivo (Noretinodrel)			Controllo negativo (OTES)			TB e NSB		
A	Bianco (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (controllo con solvente) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1\times10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1\times10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1\times10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Controllo con tampone		
F	E2 ($1\times10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1\times10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Bianco (E2 caldo) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1\times10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

(1) Organizzazione dei campioni per la piastra da microtitolazione standard da analizzare per ciascun esperimento.
(2) N.B. questa piastra da microtitolazione è preparata con le diluizioni ottenute nella piastra di diluizione conformemente agli standard delle sezioni precedenti.
In questo esempio, il ligando debole è noretinodrel (NE)
(*) bianco reale, pozzetti non utilizzati
(**) bianco, non usato durante l'incubazione, ma usato per confermare la radioattività totale aggiunta.

Tabella 5

Configurazione della piastra da microtitolazione per la prova di legame competitivo, piastre aggiuntive per le sostanze chimiche in esame e i controlli della piastra.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Sostanza chimica in esame-1 (TC-1)			Sostanza chimica in esame-2 (TC-2)			Sostanza chimica in esame-3 (TC-3)			Controlli		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7}M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E_2 (IC_{50})		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1\times10^{-4.5}$M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (Controllo con solvente)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

In questo esempio, il ligando debole è noretinodrel (NE)

Completamento della prova di legame competitivo

37. Tutti i pozzetti, ad eccezione di quelli che servono a determinare il legame totale e i pozzetti per i bianchi (con ligando caldo), come indicato nella tabella 6, ricevono 50 µl di soluzione tamponata, quindi mescolata con 10 µl di controllo con solvente, di sostanza estrogenica di riferimento (E2), di ligando debole, di non ligando, e delle sostanze chimiche in esame, rispettivamente, e di 10 µl di una soluzione di [^{3}H]-17β-estradiolo a 5 nM. Infine, si aggiungono ai pozzetti di ciascuna piastra 30µl di soluzione di recettore ghiacciata e si mescola delicatamente. La soluzione di hrERα è l'ultimo reattivo aggiunto. Le piastre di prova da microtitolazione sono incubate a temperatura ambiente (da 22 °C a 28 °C) per 2 ore.

Tabella 6

Volume dei costituenti della prova di legame competitivo all'hrER, piastre da microtitolazione

Fasi della preparazione		Pozzetti diversi da TB	Pozzetti TB	Bianco (E2 caldo)
Volume dei componenti da versare nei pozzetti di prova, e ordine dell'aggiunta	Soluzione tamponata a temperatura ambiente	50 µl	60 µl	90 µl
	E2 non marcato, ligando debole, non ligando, solvente e sostanze chimiche in esame (*)	10 µl	–	–
	[^{3}H]-17β-estradiolo in quantità sufficiente per una concentrazione finale di 0,5 nM (ossia 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	Concentrazione di hrERα come determinata (cfr. i paragrafi 12-13)	30 µl	30 µl	-
Volume totale in ciascun pozzetto di prova		100 µl	100 µl	100 µl

(*) preparato adeguatamente per ottenere la concentrazione finale di solvente accettabile

38. Il [^{3}H]-17β-estradiolo legato all'hrERα è separato dal [^{3}H]-17β-estradiolo libero aggiungendo 100 µl di sospensione fredda di DCC in ogni pozzetto, e quindi quantificato seguendo il metodo descritto nei paragrafi da 21 a 23 dell'appendice 3 per la prova di legame a saturazione.

39. I pozzetti G10-G12 e H10-H12 (identificati come «bianco (E2 caldo)» nella tabella 4) forniscono le disintegrazioni al minuto del [^{3} H]-estradiolo in 10 µl. Le aliquote di 10 µl sono versate direttamente nel liquido di scintillazione.

Criteri di accettabilità

Prova di legame a saturazione

40. La curva di legame specifica deve raggiungere un plateau man mano che si utilizzano concentrazioni crescenti di [^{3}H]-17β-estradiolo, il che indica la saturazione degli hrERα con il ligando.

41. Il legame specifico di [^{3}H] -17β-estradiolo a 0,5 nM deve corrispondere ad un intervallo accettabile di 30-50 % della media della radioattività in tutte le batteria di prove. Sono ammissibili lievi escursioni al di fuori di tale intervallo, ma se ciò avviene costantemente o se una particolare batteria di prove dà risultati significativamente al di fuori di tale intervallo, occorre adattare la concentrazione delle proteine e ripetere la prova di legame a saturazione.

42. I dati devono generare un grafico di Scatchard lineare.

43. Il legame non specifico non deve essere eccessivo: il valore è generalmente inferiore al 35 % del legame totale. Tuttavia, il rapporto può occasionalmente eccedere tale limite quando si misurano disintegrazioni al minuto molto deboli per la concentrazione più bassa di 17β-estradiolo radiomarcato testata.

Prova di legame competitivo

44. Crescenti concentrazioni di 17β-estradiolo dovrebbero spiazzare il [^{3}H]-17β-estradiolo dal recettore secondo un modello di legame competitivo in un unico sito.

45. Il valore IC_{50} per la sostanza estrogenica di riferimento (17β-estradiolo) deve essere approssimativamente uguale alla concentrazione molare di [^{3}H]-17β-estradiolo più la K_d stabilita per la prova di legame a saturazione.

46. Il legame specifico totale deve situarsi costantemente nell'intervallo di 40 ± 10 % quando la concentrazione media della radioattività totale aggiunta a ciascun pozzetto è di 0,5 nM in tutte le batterie di prove. Sono ammissibili lievi escursioni al di fuori di tale intervallo, ma se ciò avviene costantemente o se una particolare batteria di prove dà risultati significativamente al di fuori di tale intervallo, occorre adattare la concentrazione delle proteine.

47. Il solvente non deve alterare la sensibilità o la riproducibilità della prova. I risultati del controllo con solvente (pozzetti TB) sono confrontati con il controllo con soluzione tamponata per verificare che il solvente utilizzato non interagisca con il sistema di prova. Se il solvente non influisce sulla prova, i risultati del TB e del controllo con soluzione tamponata devono essere comparabili.

48. Il non ligando non dovrebbe spiazzare più del 25 % di [^{3}H]-17β-estradiolo dall'hrERα durante la prova fino a 10^{-3} M (OTES) o 10^{-4} M (DBP).

49. Sono stati definiti criteri di prestazione per la sostanza estrogenica di riferimento e per i due ligandi deboli (ad esempio, noretinodrel, noretindrone) utilizzando i dati dello studio di validazione della prova di legame all'hrER del CERI (allegato N del riferimento 2). Vengono forniti intervalli di confidenza al 95 % per la media ± SD (n) per tutti i cicli di controllo effettuati da quattro laboratori che partecipano allo studio di validazione. Gli intervalli di confidenza al 95 % sono stati calcolati per i parametri di approssimazione della curva (ossia, il vertice e la base della curva, la pendenza di Hill, il $\log IC_{50}$) per la sostanza estrogenica di riferimento e i ligandi deboli e per il $\log_{10}$ RBA dei ligandi deboli rispetto alla sostanza estrogenica di riferimento. La tabella 1 fornisce gli intervalli attesi per i parametri di approssimazione della curva che possono essere utilizzati come criteri di prestazione. In pratica, l'intervallo della IC_{50} può variare leggermente in funzione della K_d, derivata sperimentalmente, della preparazione dei recettori e della concentrazione del ligando utilizzata per la prova.

50. Non sono stati sviluppati criteri di prestazione per i parametri di approssimazione della curva per le sostanze chimiche in esame poiché esiste una grande diversità delle sostanze chimiche che possono essere potenzialmente oggetto di prova così come una grande variazione nelle affinità e risultati potenziali corrispondenti (ad es. approssimazione completa, parziale o nulla delle curve). Tuttavia, è necessario ricorrere al giudizio professionale di un esperto per analizzare i risultati di ciascuna batteria di prove su una sostanza chimica in esame. Occorre usare un intervallo di concentrazioni della sostanza chimica in esame sufficiente per definire chiaramente il vertice della curva di legame competitivo (ad es. 90-100 % di legame). La variabilità fra le repliche di ciascuna concentrazione della sostanza chimica in esame, nonché tra le tre batterie di prove non concomitanti deve essere ragionevole e giustificabile sotto il profilo scientifico. I controlli di ciascuna batteria di prove sulla sostanza in esame devono avvicinarsi alle misure di prestazione riportate per questo saggio del CERI ed essere coerenti con i dati storici di controllo di ciascun rispettivo laboratorio.

ANALISI DEI DATI

Prova di legame a saturazione

51. La prova misura il legame totale e il legame non specifico. Tali valori permettono di calcolare il legame specifico indotto da concentrazioni crescenti di [^{3}H]-17β-estradiolo in condizioni di equilibrio, sottraendo il legame non specifico dal legame totale. La curva che rappresenta il legame specifico in funzione della concentrazione di [^{3}H]-17β-estradiolo deve raggiungere un plateau per il legame specifico massimo, che indica la saturazione degli hrERα con il [^{3}H]-17β-estradiolo. Inoltre, l'analisi dei dati documenta il legame del [^{3}H]-17β-estradiolo a un unico sito di legame ad alta affinità. La curva di legame a saturazione deve indicare il legame non specifico, il legame totale e il legame specifico. Una regressione non lineare consente di approfondire l'analisi dei dati (ad es. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995), e i risultati finali sono presentati sotto forma di grafico di Scatchard.

52. L'analisi dei dati deve determinare la B_{max} e la K_d sulla base dei soli dati di legame totale, nell'ipotesi che il legame non specifico sia lineare, a meno che venga fornita una giustificazione dell'utilizzo di un altro metodo. Inoltre, si determina la migliore approssimazione delle curve mediante una solida analisi di regressione; in caso contrario se ne deve fornire la motivazione. Va indicato il metodo scelto per questa solida analisi di regressione. Una correzione relativa alla perdita di ligando (ad es. con il metodo di Swillens, 1995) va sempre applicata per determinare la B_{max} e la K_d a partire dai dati di legame a saturazione.

Prova di legame competitivo

53. La curva di legame competitivo presenta il legame specifico del [^{3}H]-17β-estradiolo in funzione della concentrazione (in $\log_{10}$) del competitore. La concentrazione della sostanza chimica in esame che inibisce il 50 % del legame massimo specifico di [^{3}H]-17β-estradiolo corrisponde al valore IC_{50}.

54. Le stime dei valori di $\log(IC_{50})$ per i controlli positivi (ad es. sostanza estrogenica di riferimento e ligando debole) sono determinate utilizzando un software di approssimazione delle curve con regressione non lineare appropriata che si basa su un'equazione di Hill a quattro parametri (ad es. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Tali approssimazioni sono effettuate senza imporre restringimenti al vertice e alla base della curva, alla pendenza e al $\log(IC_{50})$. Si determina la migliore approssimazione delle curve mediante una solida analisi di regressione; in caso contrario se ne deve fornire la motivazione. Non va applicata la correzione relativa alla perdita di ligandi. In seguito all'analisi iniziale, ciascuna curva di legame deve essere rivista per garantire la migliore approssimazione al modello. L'affinità di legame relativa (RBA) di un ligando debole è espressa in percentuale corrispondente al rapporto tra $\log(IC_{50})$ del ligando debole e il $\log(IC_{50})$ del 17β-estradiolo. I risultati dei controlli positivi e del controllo non ligando devono essere valutati in base alle misurazioni della prestazione della prova indicate nei paragrafi 44-49 dell'appendice 3.

55. I dati relativi a tutte le sostanze chimiche in esame devono essere analizzati mediante un approccio graduale per garantire un'adeguata classificazione dei dati e un'adeguata classificazione di ciascuna curva di legame competitivo. Si raccomanda che, all'inizio, ciascuna batteria di prove per una sostanza chimica in esame sia sottoposta a un'analisi normalizzata dei dati, identica a quella utilizzata per la sostanza estrogenica di riferimento e i controlli con ligando debole (cfr. il paragrafo 54 della presente appendice 3). Una volta completata l'analisi, si procede a un esame tecnico dei parametri di approssimazione della curva e a un esame visivo per determinare in che modo i dati corrispondono alla curva di legame competitivo ottenuta per ciascuna batteria di prove. Tale esame tecnico si basa su tre osservazioni che indicano che la prova e gli esami sono stati condotti correttamente: una diminuzione della percentuale di [^{3}H]-17β-estradiolo collegata ai siti specifici in funzione della concentrazione; una variabilità debole tra le repliche tecniche di ciascuna concentrazione chimica della sostanza chimica in esame; la coerenza dei parametri di approssimazione tra le tre batterie di prove.

Interpretazione dei dati

56. A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è considerata un ligando dell'hrERα se la curva di legame può essere approssimata e se il punto più basso della curva di risposta ottenuta per l'intervallo dei dati corrisponde a un legame inferiore al 50 % (Grafico 1).

57. A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è considerata non ligando dell'hrERα se:

— la sua curva di legame può essere approssimata e se il punto più basso sulla curva di risposta approssimata ottenuta per l'intervallo di dati corrisponde a un legame superiore al 75 %, oppure

— la sua curva di legame non può essere approssimata e se la media delle percentuali di legame non livellate di tutti i gruppi di concentrazione è superiore al 75 %.

58. Le sostanze chimiche in esame sono considerate equivoche se non è soddisfatta nessuna delle condizioni di cui sopra (ad esempio il punto più basso della curva di risposta approssimata si situa tra 76 e 51 %).

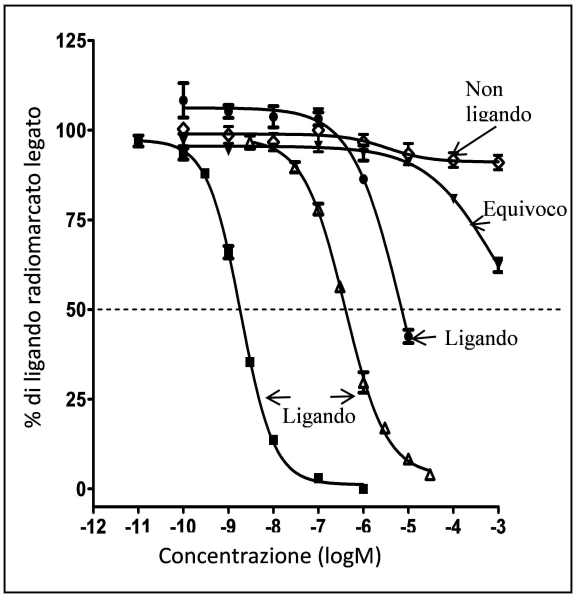
Tabella 7

Criteri di classificazione di una sostanza chimica in esame basata sulla sua curva di legame competitivo

Classificazione	Criteri
Ligando[a]	È possibile approssimare la curva di legame. Il **punto più basso della curva di risposta ottenuto per l'intervallo di dati corrisponde a un legame inferiore a 50 %.**
Non-ligando[b]	Se è possibile approssimare la curva di legame, il **punto più basso della curva di risposta approssimata ottenuto per l'intervallo di dati corrisponde a un legame superiore a 75 %.** Se non è possibile approssimare la curva di legame, la **media delle percentuali di legame non livellate di tutti i gruppi di concentrazione della prova è superiore a 75 %.**
Equivoco[c]	Una prova valutabile che non può esser classificata come ligando né non ligando. (ad esempio il punto più basso della curva di risposta approssimata si situa tra 76 e 51 %).

Grafico 1

Esempi di classificazione della sostanza chimica in esame in base ad una curva di legame competitivo



59. Le multiple prove condotte all'interno di un laboratorio su una sostanza chimica in esame sono combinate attribuendo valori numerici a ciascuna batteria di prove e calcolando la media di tali valori, come indicato nella tabella 8. I risultati combinati delle batterie di prove di ciascun laboratorio sono confrontati con la classificazione prevista per ciascuna sostanza chimica in esame.

Tabella 8

Metodo di classificazione della sostanza chimica in esame mediante multiple batterie di prove condotte all'interno di un laboratorio.

Attribuzione di un valore a ciascuna batteria di prove:	
Classificazione	**Valore numerico**
Ligando	2
Equivoco	1
Non ligando	0
Classificazione sulla base della media dei valori numerici di tutte le batterie di prove:	
Classificazione	**Valore numerico**
Ligando	Media ≥ 1,5
Equivoco	0,5 ≤ media < 1,5
Non ligando	Media < 0,5

RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DELLA PROVA

60. Cfr. il paragrafo 24 nella sezione "ELEMENTI DEL METODO DI PROVA DI LEGAME ALL'hrER" del presente metodo di prova.

Appendice 3.1

ELENCO DEI TERMINI

[^{3}H]E2: 17β-estradiolo radiomarcato con trizio

DCC: *Dextran-coated charcoal* (carbone rivestito di destrano)

E_2: 17β-estradiolo non marcato (inerte)

Soluzione di prova tamponata: soluzione di 10 mM di Tris-HCl con pH 7,4, contenente 1 mM di EDTA, 1mM di EGTA, 1 mM di NaVO3, 10 % di glicerolo, 0,2 mM di leupeptina, 1 mM di ditiotreitolo e 10 mg/ml di albumina serica bovina.

hrERα: recettore estrogenico alfa ricombinante umano (dominio di legame del ligando)

Replica: Uno dei multipli pozzetti che contengono lo stesso contenuto alle stesse concentrazioni e che sono testati contemporaneamente in un'unica batteria di prove. Nel presente protocollo, ogni concentrazione della sostanza chimica in esame è testata in triplicato; ciò significa che tre repliche di ciascuna concentrazione della sostanza chimica in esame sono testate simultaneamente.

Batteria di prove: serie completa di prove simultanee nei pozzetti di una piastra da microtitolazione che fornisce tutte le informazioni necessarie per caratterizzare l'affinità di legame all'hrERα di una sostanza chimica in esame (ossia, quantità totale di [^{3}H]-17β-estradiolo aggiunta in un pozzetto, il legame massimo all'hrERα di [^{3}H]-17β-estradiolo, il legame non specifico e il legame totale per diverse concentrazioni della sostanza chimica in esame. Una batteria di prove può consistere anche in un unico pozzetto di prova (replica) per concentrazione, ma poiché il presente protocollo richiede prove in triplicato, una batteria di prove consiste di tre pozzetti di prova per concentrazione. Inoltre, il presente protocollo impone di realizzare tre batterie di prove indipendenti (non simultanee) per sostanza chimica.

Appendice 3.2

CONFIGURAZIONE DEI POZZETTI PER LA BATTERIA DI PROVE DI LEGAME COMPETITIVO

Piastra	**Posizione**	**Replica**	**Tipo di pozzetto**	**Codice del pozzetto**	**Codice della concentrazione**	**Concentrazione iniziale del competitore (M)**	**Volume di soluzione madre di hrER (µl)**	**Volume di soluzione tamponata (µl)**	**Volume di tracciante (E2 caldo) (µl)**	**Volume della piastra di diluizione (µl)**	**Volume finale (µl)**	**Concentrazione finale del competitore (M)**
S	A1	1	Bianco	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Bianco	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Bianco	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	E2 freddo	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	E2 freddo	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	E2 freddo	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	E2 freddo	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	E2 freddo	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	E2 freddo	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	E2 freddo	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	E2 freddo	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10

Piastra	Posizione	Replica	Tipo di pozzetto	Codice del pozzetto	Codice della concentrazione	Concentrazione iniziale del competitore (M)	Volume di soluzione madre di hrER (µl)	Volume di soluzione tamponata (µl)	Volume di tracciante (E2 caldo) (µl)	Volume della piastra di diluizione (µl)	Volume finale (µl)	Concentrazione finale del competitore (M)
S	D3	3	E2 freddo	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	E1	1	E2 freddo	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	E2 freddo	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	E2 freddo	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	E2 freddo	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F2	2	E2 freddo	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F3	3	E2 freddo	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	G1	1	E2 freddo	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G2	2	E2 freddo	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	E2 freddo	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	E2 freddo	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	E2 freddo	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	E2 freddo	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07

Piastra	Posizione	Replica	Tipo di pozzetto	Codice del pozzetto	Codice della concentrazione	Concentrazione iniziale del competitore (M)	Volume di soluzione madre di hrER (µl)	Volume di soluzione tamponata (µl)	Volume di tracciante (E2 caldo) (µl)	Volume della piastra di diluizione (µl)	Volume finale (µl)	Concentrazione finale del competitore (M)
S	A4	1	Noretinodrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	Noretinodrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	Noretinodrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	Noretinodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	Noretinodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	Noretinodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	Noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C5	2	Noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C6	3	Noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	D4	1	Noretinodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	Noretinodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	Noretinodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	Noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07

Piastra	Posizione	Replica	Tipo di pozzetto	Codice del pozzetto	Codice della concentrazione	Concentrazione iniziale del competitore (M)	Volume di soluzione madre di hrER (µl)	Volume di soluzione tamponata (µl)	Volume di tracciante (E2 caldo) (µl)	Volume della piastra di diluizione (µl)	Volume finale (µl)	Concentrazione finale del competitore (M)
S	E5	2	Noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E6	3	Noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	F4	1	Noretinodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	Noretinodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	Noretinodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	Noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G5	2	Noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G6	3	Noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	H4	1	Noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H5	2	Noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H6	3	Noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

Piastra	Posizione	Replica	Tipo di pozzetto	Codice del pozzetto	Codice della concentrazione	Concentrazione iniziale del competitore (M)	Volume di soluzione madre di hrER (µl)	Volume di soluzione tamponata (µl)	Volume di tracciante (E2 caldo) (µl)	Volume della piastra di diluizione (µl)	Volume finale (µl)	Concentrazione finale del competitore (M)
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Piastra	Posizione	Replica	Tipo di pozzetto	Codice del pozzetto	Codice della concentrazione	Concentrazione iniziale del competitore (M)	Volume di soluzione madre di hrER (µl)	Volume di soluzione tamponata (µl)	Volume di tracciante (E2 caldo) (µl)	Volume della piastra di diluizione (µl)	Volume finale (µl)	Concentrazione finale del competitore (M)
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8D-BP7	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES88	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	A10	1	legame totale	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
S	A11	2	legame totale	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	legame totale	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	legame totale	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—

Piastra	Posizione	Replica	Tipo di pozzetto	Codice del pozzetto	Codice della concentrazione	Concentrazione iniziale del competitore (M)	Volume di soluzione madre di hrER (µl)	Volume di soluzione tamponata (µl)	Volume di tracciante (E2 caldo) (µl)	Volume della piastra di diluizione (µl)	Volume finale (µl)	Concentrazione finale del competitore (M)
S	B11	5	legame totale	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	legame totale	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	E2 freddo (elevato)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	E2 freddo (elevato)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	E2 freddo (elevato)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	E2 freddo (elevato)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D11	5	E2 freddo (elevato)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D12	6	E2 freddo (elevato)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	Ctrl con tampone	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	Ctrl con tampone	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	Ctrl con tampone	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	Ctrl con tampone	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	Ctrl con tampone	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	Ctrl con tampone	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	Bianco (E2 caldo)	caldo	H1	—	90	—	10	—	100	—

Piastra	Posizione	Replica	Tipo di pozzetto	Codice del pozzetto	Codice della concentrazione	Concentrazione iniziale del competitore (M)	Volume di soluzione madre di hrER (µl)	Volume di soluzione tamponata (µl)	Volume di tracciante (E2 caldo) (µl)	Volume della piastra di diluizione (µl)	Volume finale (µl)	Concentrazione finale del competitore (M)
S	G11 (*)	2	Bianco (E2 caldo)	caldo	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	Bianco (E2 caldo)	caldo	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	Bianco (E2 caldo)	caldo	H4	—	90	—	10	—	100	—
S	H11 (*)	5	Bianco (E2 caldo)	caldo	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	Bianco (E2 caldo)	caldo	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	Sconosciuto 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	Sconosciuto 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	Sconosciuto 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	Sconosciuto 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	Sconosciuto 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	Sconosciuto 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	Sconosciuto 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	Sconosciuto 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	Sconosciuto 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08

Piastra	Posizione	Replica	Tipo di pozzetto	Codice del pozzetto	Codice della concentrazione	Concentrazione iniziale del competitore (M)	Volume di soluzione madre di hrER (µl)	Volume di soluzione tamponata (µl)	Volume di tracciante (E2 caldo) (µl)	Volume della piastra di diluizione (µl)	Volume finale (µl)	Concentrazione finale del competitore (M)
P1	D1	1	Sconosciuto 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	Sconosciuto 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	Sconosciuto 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	Sconosciuto 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	Sconosciuto 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	Sconosciuto 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	Sconosciuto 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	Sconosciuto 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	Sconosciuto 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	Sconosciuto 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	Sconosciuto 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	Sconosciuto 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	Sconosciuto 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	Sconosciuto 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

Piastra	Posizione	Replica	Tipo di pozzetto	Codice del pozzetto	Codice della concentrazione	Concentrazione iniziale del competitore (M)	Volume di soluzione madre di hrER (µl)	Volume di soluzione tamponata (µl)	Volume di tracciante (E2 caldo) (µl)	Volume della piastra di diluizione (µl)	Volume finale (µl)	Concentrazione finale del competitore (M)
P1	H3	3	Sconosciuto 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	Sconosciuto 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	Sconosciuto 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	Sconosciuto 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	Sconosciuto 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	Sconosciuto 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	Sconosciuto 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	Sconosciuto 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	Sconosciuto 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	Sconosciuto 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	Sconosciuto 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	Sconosciuto 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	Sconosciuto 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	Sconosciuto 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Piastra	Posizione	Replica	Tipo di pozzetto	Codice del pozzetto	Codice della concentrazione	Concentrazione iniziale del competitore (M)	Volume di soluzione madre di hrER (µl)	Volume di soluzione tamponata (µl)	Volume di tracciante (E2 caldo) (µl)	Volume della piastra di diluizione (µl)	Volume finale (µl)	Concentrazione finale del competitore (M)
P1	E5	2	Sconosciuto 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	Sconosciuto 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	Sconosciuto 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	Sconosciuto 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	Sconosciuto 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	Sconosciuto 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	Sconosciuto 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	Sconosciuto 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	Sconosciuto 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	Sconosciuto 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	Sconosciuto 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A7	1	Sconosciuto 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	Sconosciuto 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A9	3	Sconosciuto 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

Piastra	Posizione	Replica	Tipo di pozzetto	Codice del pozzetto	Codice della concentrazione	Concentrazione iniziale del competitore (M)	Volume di soluzione madre di hrER (µl)	Volume di soluzione tamponata (µl)	Volume di tracciante (E2 caldo) (µl)	Volume della piastra di diluizione (µl)	Volume finale (µl)	Concentrazione finale del competitore (M)
P1	B7	1	Sconosciuto 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	Sconosciuto 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	Sconosciuto 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	Sconosciuto 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	Sconosciuto 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	Sconosciuto 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	Sconosciuto 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	Sconosciuto 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	Sconosciuto 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	Sconosciuto 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	Sconosciuto 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	Sconosciuto 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	Sconosciuto 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	Sconosciuto 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05

Piastra	Posizione	Replica	Tipo di pozzetto	Codice del pozzetto	Codice della concentrazione	Concentrazione iniziale del competitore (M)	Volume di soluzione madre di hrER (µl)	Volume di soluzione tamponata (µl)	Volume di tracciante (E2 caldo) (µl)	Volume della piastra di diluizione (µl)	Volume finale (µl)	Concentrazione finale del competitore (M)
P1	F9	3	Sconosciuto 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	Sconosciuto 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G8	2	Sconosciuto 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G9	3	Sconosciuto 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H7	1	Sconosciuto 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H8	2	Sconosciuto 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H9	3	Sconosciuto 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A10	1	Controllo E2 (max)	S	E2max1	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A11	2	Controllo E2 (max)	S	E2max2	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A12	3	Controllo E2 (max)	S	E2max3	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	B10	1	Controllo E2 (IC50)	S	E2IC501	E2IC50x-10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B11	2	Controllo E2 (IC50)	S	E2IC502	E2IC50x-10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	Controllo E2 (IC50)	S	E2IC503	E2IC50x-10	30	50	10	10	100	E2IC50

Piastra	Posizione	Replica	Tipo di pozzetto	Codice del pozzetto	Codice della concentrazione	Concentrazione iniziale del competitore (M)	Volume di soluzione madre di hrER (µl)	Volume di soluzione tamponata (µl)	Volume di tracciante (E2 caldo) (µl)	Volume della piastra di diluizione (µl)	Volume finale (µl)	Concentrazione finale del competitore (M)
P1	C10	1	Controllo NE (max)	S	Nemax1	1.00E-3,5	30	50	10	10	100	1.00E-4,5
P1	C11	2	Controllo NE (max)	S	Nemax2	1.00E-3,5	30	50	10	10	100	1.00E-4,5
P1	C12	3	Controllo NE (max)	S	Nemax3	1.00E-3,5	30	50	10	10	100	1.00E-4,5
P1	D10	1	Controllo NE (IC50)	S	NEIC501	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	Controllo NE (IC50)	S	NEIC502	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	Controllo NE (IC50)	S	NEIC503	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	E2 freddo (elevato)	NSB	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	E2 freddo (elevato)	NSB	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	E2 freddo (elevato)	NSB	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	E2 freddo (elevato)	NSB	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	E2 freddo (elevato)	NSB	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	E2 freddo (elevato)	NSB	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Piastra	Posizione	Replica	Tipo di pozzetto	Codice del pozzetto	Codice della concentrazione	Concentrazione iniziale del competitore (M)	Volume di soluzione madre di hrER (µl)	Volume di soluzione tamponata (µl)	Volume di tracciante (E2 caldo) (µl)	Volume della piastra di diluizione (µl)	Volume finale (µl)	Concentrazione finale del competitore (M)
P1	G10	1	legame totale	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	legame totale	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	legame totale	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
P1	H10	4	legame totale	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	legame totale	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	legame totale	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—

(*) N.B. I pozzetti "caldi" sono vuoti durante l'incubazione. I 10 µl che sono aggiunti successivamente servono soltanto per il conteggio per scintillazione. **Configurazione dei pozzetti per la batteria di prove di legame competitivo**

Appendice 4

CONSIDERAZIONI RELATIVE ALL'ANALISI DEI DATI DELLA PROVA DI LEGAME COMPETITIVO ALL'HRER

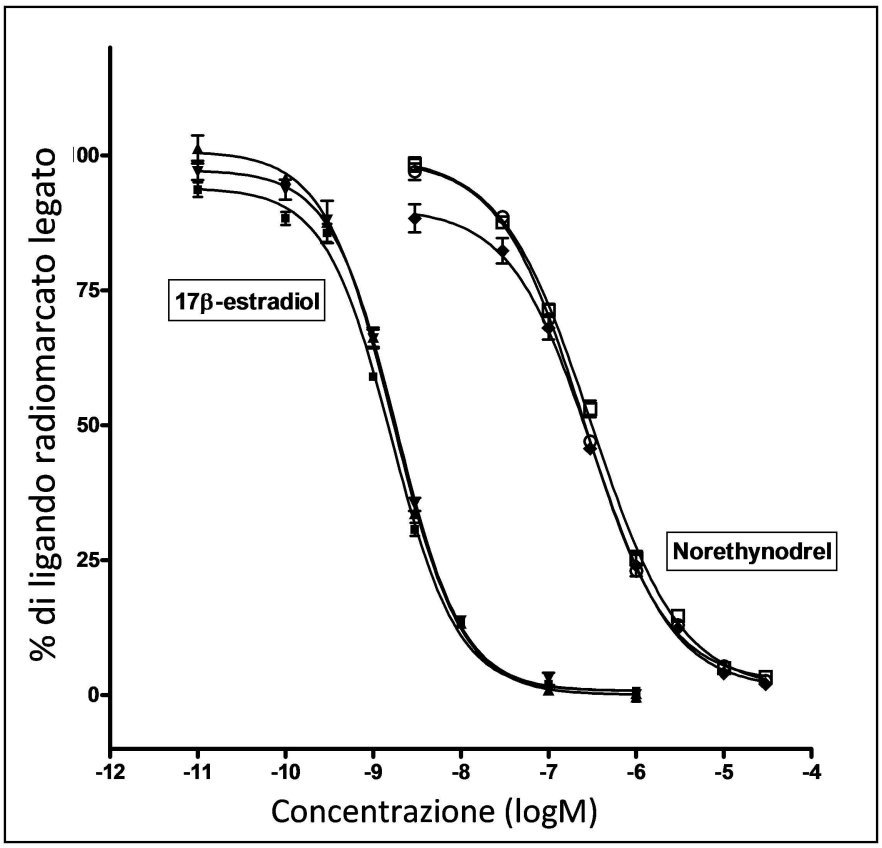
1. La prova di legame competitivo all'hrERα misura i legami del [^{3}H]-17β-estradiolo in concentrazione fissa in presenza di concentrazioni crescenti della sostanza chimica in esame. La curva di legame competitivo presenta il legame specifico del [^{3}H]-17β-estradiolo in funzione della concentrazione (in $\log_{10}$) del competitore. La concentrazione della sostanza chimica in esame che inibisce il 50 % del legame massimo specifico del [^{3}H]-17β-estradiolo corrisponde al valore IC_{50}.

   Analisi dei dati per la sostanza estrogenica di riferimento e il ligando debole (1)

2. I dati delle batterie di prove sui controlli sono trasformati (in percentuale di legame specifico del [^{3}H]-17β-estradiolo e logaritmo della concentrazione della sostanza chimica di controllo) per le ulteriori analisi. Le stime dei valori di $\log(IC_{50})$ per i controlli positivi (ad es. sostanza estrogenica di riferimento e ligando debole) sono determinate utilizzando un idoneo software di approssimazione delle curve con regressione non lineare che si basa su un'equazione di Hill a quattro parametri (ad es. BioSoft; GraphPad Prism) (2). Tali approssimazioni possono generalmente essere effettuate senza imporre limiti al vertice e alla base della curva, alla pendenza e al $\log(I_{C50})$. Si determina la migliore approssimazione delle curve mediante una solida analisi di regressione; in caso contrario se ne deve fornire la motivazione. Va indicato il metodo scelto per questa solida analisi di regressione. I saggi di FW o del CERI sul legame all'hrER non richiedono alcuna correzione relativa alla perdita di ligandi, che però può essere presa in considerazione se necessario. In seguito all'analisi iniziale, ciascuna curva di legame deve essere rivista per garantire la conformità al modello. L'affinità di legame relativa (RBA) di un ligando debole può essere calcolata come percentuale del log (IC_{50}) per il ligando debole relativa al log (IC_{50}) per il 17β-estradiolo. I risultati ottenuti per i controlli positivi e il controllo non ligando devono essere valutati mediante misure di prestazione della prova e criteri di accettabilità descritti nel presente metodo di prova (paragrafo 20), appendice 2 (saggio di FW, paragrafi 41-51) e appendice 3 (saggio del CERI, paragrafi 41-51). Esempi di 3 batterie di prove per la sostanza estrogenica di riferimento e per il ligando debole figurano nel Grafico 1.

Grafico 1

Esempi di curve di legame competitivo per la sostanza estrogenica di riferimento e il ligando debole di controllo



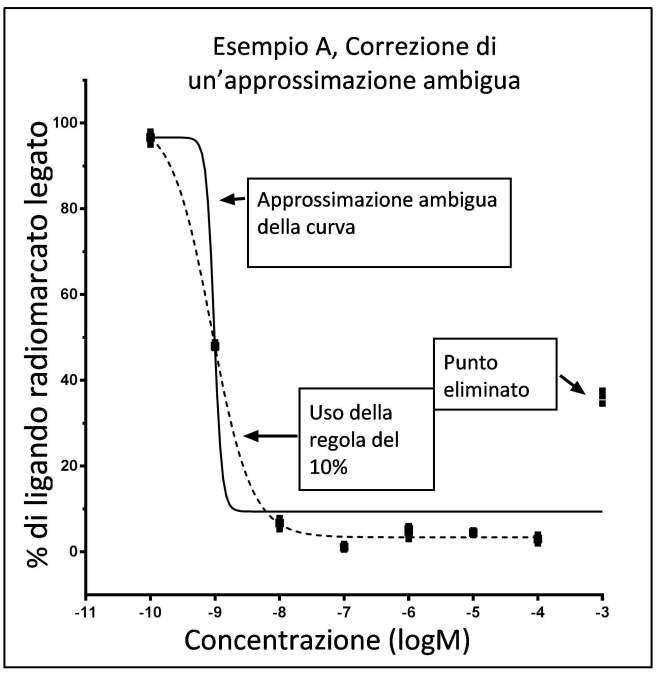
Analisi dei dati per le sostanze chimiche in esame

3. I dati relativi a tutte le sostanze chimiche in esame devono essere analizzati mediante un approccio graduale per garantire un'adeguata classificazione dei dati e un'adeguata classificazione di ciascuna curva di legame competitivo. Ciascuna batteria di prove per una sostanza chimica in esame è inizialmente sottoposta a un'analisi normalizzata dei dati, identica a quella utilizzata per la sostanza estrogenica di riferimento e i controlli con ligando debole. Una volta completata l'analisi, si procede a un esame tecnico dei parametri di approssimazione della curva e a un esame visivo per determinare in che modo i dati corrispondono alla curva di legame competitivo ottenuta per ciascuna batteria di prove. Tale esame tecnico si basa su tre osservazioni che indicano che la prova e gli esami sono stati condotti correttamente: una diminuzione della percentuale di [^{3}H]-17β-estradiolo collegata ai siti specifici in funzione della concentrazione; una variabilità debole tra le repliche tecniche di ciascuna concentrazione chimica della sostanza chimica in esame; la coerenza dei parametri di approssimazione tra le tre batterie di prove. È opportuno fare ricorso al giudizio professionale di un esperto al riesame dei risultati di ciascuna batteria di prove per la sostanza chimica in esame, e i dati utilizzati per classificare ciascuna sostanza chimica in esame come ligando o non ligando devono essere giustificabili sotto il profilo scientifico.

4. Occasionalmente alcuni dati possono richiedere un'ulteriore attenzione al fine di analizzare e interpretare in modo adeguato i dati relativi al legame all'hrER. Studi precedenti hanno rivelato casi in cui l'analisi e l'interpretazione di dati relativi al legame competitivo ai recettori possono essere complicate da una rimonta della percentuale del legame specifico per le concentrazioni di prova più elevate (Grafico 2). Si tratta di un problema ben noto che è stato riscontrato durante l'esecuzione dei protocolli in diverse prove di legame competitivo al recettore (3). In questi casi si osserva che la risposta è dipendente dalla concentrazione alle concentrazioni inferiori, ma quando la concentrazione della sostanza chimica in esame si avvicina al limite di solubilità, il [^{3}H]-17β-estradiolo cessa di essere spiazzato dalla sostanza chimica in esame. In questi casi, i dati relativi alle concentrazioni più elevate indicano che è stato raggiunto il limite biologico della prova. Ad esempio, questo fenomeno è spesso associato a insolubilità chimica e a precipitazione a forte concentrazione; potrebbe anche essere un riflesso del superamento della capacità del DCC di catturare il ligando radiomarcato libero durante il processo di separazione, alle concentrazioni chimiche più elevate. Conservare tali punti durante l'approssimazione dei dati del legame competitivo a una curva sigmoide può a volte portare a una classificazione errata del potenziale di legame all'ER di una sostanza chimica in esame (Grafico 2). Per evitare tale situazione, i protocolli per i saggi di FW e del CERI includono un'opzione per escludere punti di dati dalle analisi quando la media delle repliche per la percentuale di legame specifico del [^{3}H]-17β-estradiolo supera del 10 % o più la media del legame osservato a una concentrazione inferiore (ciò è spesso denominato "regola del 10 %"). Questa regola può essere utilizzata una sola volta per una determinata curva e devono essere disponibili dati relativi ad almeno 6 concentrazioni affinché la curva possa essere correttamente classificata.

Grafico 2

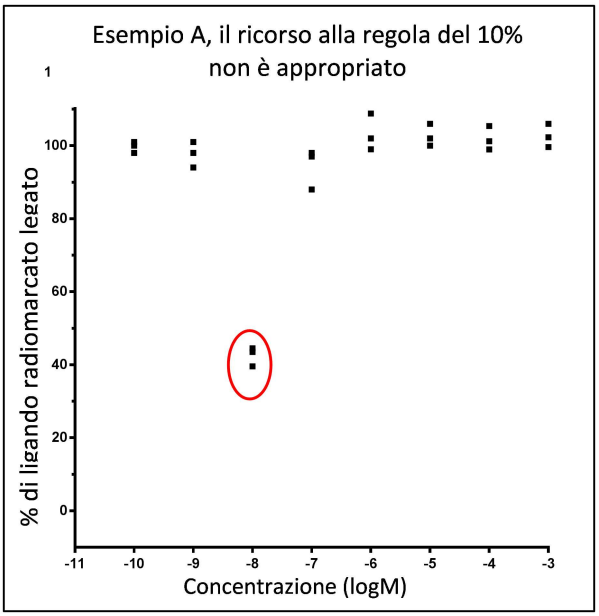
Esempi di curve di legame competitivo con e senza applicazione della regola del 10 %.

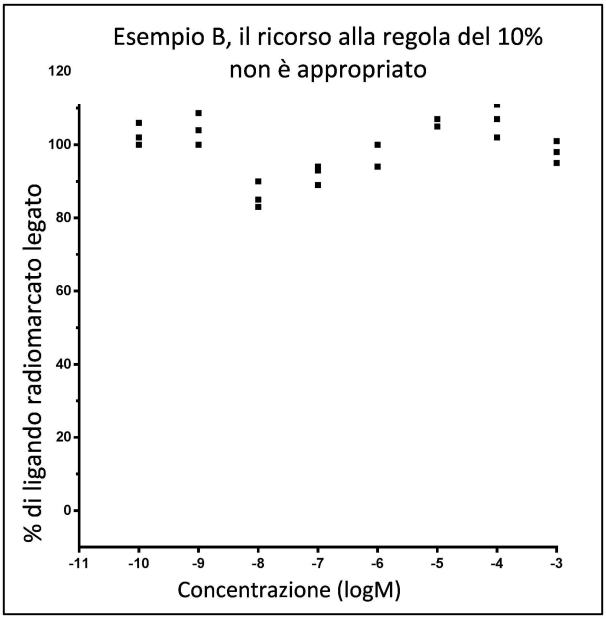


5. Occorre considerare attentamente se è appropriato applicare la regola del 10 % per correggere tali curve; la regola va riservata alle sostanze chimiche per le quali esistono forti indicazioni che siano dei ligandi dell'hrER. Nel corso della sperimentazione effettuata per lo studio di validazione del saggio di FW di legame all'hrER è stato osservato che la regola del 10 % può, a volte, avere conseguenze indesiderate e impreviste. Infatti, le sostanze chimiche che non interagivano con il recettore (ossia, non ligandi) mostravano spesso una variabilità superiore al 10 % nell'insieme delle concentrazioni testate, quando il legame del ligando radiomarcato era vicino al 100 %. Se il valore di legame più basso corrisponde a una concentrazione debole, l'applicazione della regola del 10 % potrebbe comportare l'eliminazione dall'analisi dei dati di tutte le concentrazioni superiori, anche se tali concentrazioni potrebbero essere utili per stabilire che la sostanza chimica è un non ligando. Il grafico 3 mostra alcuni esempi in cui il ricorso alla regola del 10 % non è appropriato.

Grafico 3

Esempi di curve di legame competitivo in cui non è appropriato applicare la regola del 10 %





BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2015). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Motulsky H. and Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, pp 187-191. Www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf

(3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.

B.71 PROVE DI SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA *IN VITRO* RIGUARDANTI L'EVENTO CHIAVE NELL'ATTIVAZIONE DI CELLULE DENDRITICHE NEL MECCANISMO D'AZIONE DEGLI EFFETTI AVVERSI (AOP) PER LA SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA

INTRODUZIONE GENERALE

Metodo di prova basato sull'evento chiave nell'attivazione di cellule dendritiche

1. Per sensibilizzante cutaneo si intende una sostanza che provoca una reazione allergica a contatto con la pelle, secondo la definizione del Sistema globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (UN GHS) (1) e del regolamento (CE) n. 1272/2008 dell'Unione europea relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele (CLP) ([1]). Vi è consenso generale circa le principali fasi del processo biologico di sensibilizzazione cutanea. Le attuali conoscenze relative ai meccanismi chimici e biologici associati alla sensibilizzazione cutanea sono state riassunte nel concetto del meccanismo d'azione degli effetti avversi (*AOP, Adverse Outcome Pathway*) nell'ambito del programma AOP dell'OCSE (2), che va dall'evento molecolare scatenante fino agli effetti avversi per la salute (dermatite allergica da contatto), passando attraverso le fasi intermedie. In questo caso l'evento molecolare scatenante (cioè il primo evento chiave) è il legame covalente tra sostanze chimiche elettrofile e i centri nucleofili nelle proteine della pelle. Il secondo evento chiave nell'AOP avviene a livello di cheratinociti e comprende risposte infiammatorie e variazioni di espressione genica, associate a specifiche vie di segnalazione intercellulare come le vie dipendenti dall'elemento di risposta antiossidante/elettrofilo (*ARE, Antioxidant Response Element*). Il terzo evento chiave è l'attivazione di cellule dendritiche (DC), generalmente valutata attraverso l'espressione di specifici marcatori di superficie cellulare, chemochine e citochine. Il quarto evento chiave è l'attivazione e proliferazione dei linfociti T, valutata indirettamente con il test sui linfonodi locali (LLNA) su topi (3).

2. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 442E (2017). Esso descrive i saggi *in vitro* riguardanti i meccanismi descritti nell'ambito dell'evento chiave nell'attivazione di cellule dendritiche dell'AOP per la sensibilizzazione cutanea (2). Il metodo di prova comprende prove da utilizzare per distinguere i sensibilizzanti dai non sensibilizzanti cutanei, secondo la definizione del sistema UN GHS e della classificazione CLP.

   Nel presente metodo di prova sono descritte le prove seguenti:

   — test di attivazione della linea cellulare umana - (h-CLAT)

   — test di attivazione della linea cellulare U937 - (U-SENS™)

   — test con il gene reporter dell'interleuchina-8 (metodo di prova IL-8 Luc).

3. Le prove facenti parte del presente metodo di prova e la corrispondente linea guida dell'OCSE possono differire per quanto riguarda la procedura utilizzata per generare i dati e i risultati misurati, ma possono essere indifferentemente utilizzate per rispondere alle esigenze dei paesi in materia di risultati sperimentali riguardanti l'evento chiave nell'attivazione di cellule dendritiche nell'AOP di sensibilizzazione cutanea, beneficiando nel contempo del sistema di accettazione reciproca dei dati nel quadro dell'OCSE.

([1]) Regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2008, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006 (GU L 353 del 31.12.2008, pag. 1).

Fondamenti e principi delle prove comprese nel metodo di prova basato sull'evento chiave

4. Tipicamente, la valutazione della sensibilizzazione cutanea è effettuata su cavie. I metodi classici che utilizzano cavie - il test di massimizzazione su cavie (*Guinea Pig Maximisation Test*, GPMT) di Magnusson e Kligman e il test di Buehler (metodo di prova B.6) (4) - valutano sia le fasi di induzione che quelle di reazione della sensibilizzazione cutanea. Sono inoltre utilizzati test sui topi - il test LLNA (metodo di prova B.42) (3) e le sue due varianti non radioattive, LLNA: DA (metodo di prova B.50) (5) e LLNA: BrdU-ELISA (metodo di prova B.51) (6) - che riguardano esclusivamente la reazione di induzione, garantendo un vantaggio rispetto ai test su cavie per quanto riguarda il benessere degli animali e la possibilità di ottenere una misurazione obiettiva della fase di induzione della sensibilizzazione cutanea.

5. Per contribuire alla valutazione del potenziale di sensibilizzazione cutanea delle sostanze chimiche sono stati recentemente adottati metodi di prova *in chemico* e *in vitro* di tipo meccanicistico riguardanti il primo evento chiave [metodo di prova B.59; saggio di reattività peptidica diretta (7)] e il secondo evento chiave [metodo di prova B.60; metodo di prova della luciferasi ARE-Nrf2 (8)] dell'AOP di sensibilizzazione cutanea.

6. Le prove descritte nel presente metodo di prova consentono di quantificare la variazione di espressione dei marcatori di superficie cellulare associati al processo di attivazione di monociti e DC in seguito all'esposizione a sensibilizzanti (ad es. CD54, CD86) o le variazioni di espressione di IL-8, una citochina associata all'attivazione di DC. È stato segnalato che i sensibilizzanti cutanei inducono l'espressione di marcatori di membrana cellulare associati all'attivazione di DC (2), quali CD40, CD54, CD80, CD83 e CD86, nonché di citochine proinfiammatorie quali IL-1β e TNF-α e di varie chemochine, tra cui IL-8 (CXCL8) e CCL3 (9) (10) (11) (12).

7. Tuttavia, poiché l'attivazione di DC costituisce soltanto uno degli eventi chiave dell'AOP di sensibilizzazione cutanea (2) (13), le informazioni ricavate da prove che misurano unicamente i marcatori dell'attivazione di DC possono non essere sufficienti per stabilire se una sostanza chimica presenta o no un potenziale di sensibilizzazione cutanea. Pertanto i dati ricavati dalle prove descritte nel presente metodo di prova possono contribuire a distinguere tra sensibilizzanti (categoria 1 del GHS dell'ONU/CLP) e non sensibilizzati cutanei se utilizzati nell'ambito di approcci integrati in materia di prove e valutazioni (IATA), in combinazione con altre informazioni complementari ricavate ad esempio da saggi *in vitro* che prendano in esame altri eventi chiave dell'AOP di sensibilizzazione cutanea nonché da metodi non sperimentali, compresi i metodi *read-across* utilizzati con sostanze chimiche analoghe (13). Esistono in letteratura esempi di utilizzo di dati ricavati da queste prove nell'ambito di approcci definiti, vale a dire approcci standardizzati per quanto riguarda le fonti di informazione utilizzate e la procedura applicata ai dati per formulare previsioni (13), che possono costituire elementi utili nell'ambito di un approccio IATA.

8. Le prove descritte nel presente metodo di prova non possono essere utilizzate da sole, né per la classificazione dei sensibilizzanti cutanei nelle sottocategorie 1A e 1B del sistema UN GHS/CLP, per le autorità che applicano queste due sottocategorie facoltative, né per prevedere la potenza di sensibilizzazione in sede di valutazione della sicurezza. Tuttavia, in funzione del quadro normativo applicabile, i risultati positivi ottenuti con questi metodi possono essere usati isolatamente per classificare una sostanza chimica nella categoria 1 del GHS dell'ONU/CLP.

9. Il termine «sostanza chimica in esame» utilizzato nel presente metodo di prova designa l'oggetto della prova ([1]) e non si riferisce all'applicabilità delle prove per testare sostanze monocostituente, sostanze multicostituente e/o miscele. Attualmente disponiamo di informazioni limitate quanto all'applicabilità delle prove a sostanze multicostituente e a miscele (14) (15). Le prove sono comunque tecnicamente applicabili alle prove su sostanze multicostituente e miscele. Tuttavia, prima di applicare questo metodo di prova a una miscela per ottenere dati a fini regolamentari, è opportuno chiedersi se, e in caso affermativo perché, i dati ottenuti possono essere ritenuti idonei per i fini regolamentari previsti ([2]). Tali considerazioni non sono necessarie in presenza di un obbligo normativo di prova sulla miscela. Inoltre, quando si testano sostanze multicostituente o miscele, occorre prestare attenzione alle possibili interferenze dei costituenti citotossici con le risposte osservate.

([1]) In occasione della riunione congiunta dell'OCSE del giugno 2013 è stato concordato che, ove possibile, nelle nuove linee guida aggiornate dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche l'espressione «sostanza chimica in esame» sia utilizzata in modo più coerente per designare la sostanza oggetto della prova.

([2]) Questa frase è stata proposta e concordata nella riunione del WNT dell'aprile 2014.

BIBLIOGRAFIA

(1) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Consultabile al seguente indirizzo: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Consultabile al seguente indirizzo: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En.

(3) Capitolo B.42 del presente allegato: Test sui linfonodi locali (LLNA).

(4) Capitolo B.6 del presente allegato: Sensibilizzazione cutanea.

(5) Capitolo B.50 del presente allegato: Sensibilizzazione cutanea: test sui linfonodi locali (LLNA): DA.

(6) Capitolo B.51 del presente allegato: Sensibilizzazione cutanea: test sui linfonodi locali (LLNA): BrdU-ELISA.

(7) Capitolo B.59 del presente allegato: Sensibilizzazione cutanea *in chemico*: saggio di reattività peptidica diretta (DPRA).

(8) Capitolo B.60 del presente allegato: Sensibilizzazione cutanea *in vitro*: metodo di prova della luciferasi ARE-Nrf2.

(9) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271-96.

(10) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. J Exp Med 180:1841-7.

(11) Aiba S, Terunuma A, Manome H, Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. Eur J Immunol 27:3031-8.

(12) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and DNCB. J Invest Dermatol 120:390-8.

(13) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Consultabile al seguente indirizzo: https://community.oecd.org/community/iatass.

(14) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

(15) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

Appendice 1

Sensibilizzazione Cutanea in vitro: Test di Attivazione Della Linea Cellulare Umana (h-clat)

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

1. Il metodo h-CLAT consente di quantificare le variazioni di espressione dei marcatori di superficie cellulare associati al processo di attivazione di monociti e cellule dendritiche (DC) (cioè CD86 e CD54) nella linea cellulare di leucemia monocitica umana THP-1 in seguito all'esposizione a sensibilizzanti (1)(2). I livelli misurati di espressione dei marcatori di superficie cellulare CD86 e CD54 sono quindi utilizzati per contribuire a distinguere tra sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanei.

2. Il metodo h-CLAT è stato oggetto di uno studio di validazione in uno dei laboratori di riferimento dell'Unione europea per le alternative alla sperimentazione animale (*European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing - EURL ECVAM*) e di una successiva revisione indipendente *inter pares* sotto la guida del comitato scientifico consultivo dello stesso laboratorio (ESAC). Tenuto conto di tutti i dati disponibili e dei pareri formulati dalle autorità di regolamentazione e dai portatori di interessi, l'EURL ECVAM ha raccomandato l'uso del metodo h-CLAT (3) nell'ambito di una metodologia integrata di tipo IATA per contribuire a distinguere tra sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanei a fini di classificazione ed etichettatura del pericolo. Nella letteratura scientifica figurano esempi dell'uso dei dati h-CLAT in combinazione con altre informazioni (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).

3. È stato dimostrato che il metodo h-CLAT può essere applicato in laboratori con esperienza nel campo delle tecniche di coltura cellulare e dell'analisi mediante citometria a flusso. Il livello di riproducibilità atteso delle predizioni è dell'ordine dell'80 % a livello intralaboratorio e a livello interlaboratori (3)(12). I risultati dello studio di validazione (13) e di altri studi pubblicati (14) indicano globalmente che, rispetto ai risultati ottenuti con il metodo LLNA, l'accuratezza nella distinzione tra sensibilizzanti (categoria 1 del GHS dell'ONU/CLP) e non sensibilizzanti cutanei è pari all'85 % (N = 142) per una sensibilità del 93 % (94/101) e una specificità del 66 % (27/41) [sulla base di una nuova analisi dell'EURL ECVAM (12) che ha tenuto conto di tutti i dati esistenti ma non dei risultati negativi per le sostanze chimiche con un Log K_{ow} superiore a 3,5, come descritto al paragrafo 4]. È probabile che i falsi negativi nelle predizioni formulate con il metodo h-CLAT riguardino piuttosto le sostanze chimiche con una potenza di sensibilizzazione cutanea da bassa a moderata (sottocategoria 1B del GHS dell'ONU/CLP) rispetto alle sostanze chimiche con una potenza di sensibilizzazione cutanea elevata (sottocategoria 1A del GHS dell'ONU/CLP) (4)(13)(15). Queste informazioni, nel loro insieme, indicano l'utilità del metodo h-CLAT per l'identificazione dei rischi di sensibilizzazione cutanea. Tuttavia, i valori di accuratezza forniti in questa sede per il metodo h-CLAT utilizzato isolatamente sono puramente indicativi, in quanto la prova dovrebbe essere considerata in combinazione con altre fonti di informazione nell'ambito di un approccio IATA e in conformità alle disposizioni dei paragrafi 7 e 8 dell'Introduzione generale. Inoltre, nel valutare i metodi di studio della sensibilizzazione cutanea che non utilizzano la sperimentazione animale si deve tenere presente che l'LLNA, come pure altre prove che utilizzano la sperimentazione animale, può non riflettere pienamente la situazione per l'uomo.

4. I dati attualmente disponibili indicano che il metodo h-CLAT è applicabile alle sostanze chimiche in esame relative a diversi gruppi funzionali organici, meccanismi di reazione, potenze di sensibilizzazione cutanea (determinate negli studi *in vivo*) e proprietà fisico-chimiche (3)(14)(15). Il metodo h-CLAT è applicabile alle sostanze chimiche solubili o che formano una dispersione stabile (colloide o sospensione in cui la sostanza chimica in esame non si deposita né si separa dal solvente/mezzo disperdente formando più fasi) in un solvente/disperdente idoneo (cfr. il paragrafo 14). Le sostanze chimiche con un Log K_{ow} superiore a 3,5 tendono a produrre risultati falsi negativi (14). Pertanto non si deve tener conto dei risultati negativi ottenuti da sostanze chimiche con un Log K_{ow} superiore a 3,5. Tuttavia, i risultati positivi ottenuti da sostanze chimiche che presentano un Log K_{ow} superiore a 3,5 possono comunque essere utilizzati nel processo di identificazione della sostanza chimica come sensibilizzante cutaneo. Inoltre, a causa della capacità metabolica limitata della linea cellulare utilizzata (16) e a causa delle condizioni sperimentali, anche i proapteni (sostanze che richiedono un'attivazione enzimatica, ad esempio mediante enzimi P450) e i preapteni (sostanze attivate mediante ossidazione), in particolare quelli a ossidazione lenta, possono dare risultati negativi con il metodo h-CLAT (15). Le sostanze chimiche fluorescenti possono essere valutate con il metodo h-CLAT (17); tuttavia le sostanze chimiche fortemente fluorescenti che emettono alla stessa lunghezza d'onda dell'isotiocianato di fluorescina (FITC) o dello ioduro di propidio (PI) interferiscono con la rilevazione mediante citometria a flusso e pertanto non possono essere correttamente valutate mediante anticorpi coniugati con FITC o PI. In questo caso si può fare ricorso, rispettivamente, ad altri anticorpi marcati con fluorocromo o ad altri marcatori di citotossicità, purché si possa dimostrare, ad esempio testando le sostanze di riferimento indicate nell'appendice 1-2, che essi producono risultati simili agli anticorpi marcati con FITC (cfr. il paragrafo 24) o PI (cfr. il paragrafo 18). Alla luce di quanto precede, i risultati negativi andranno interpretati nel contesto dei limiti indicati e in combinazione con altre fonti di informazione nell'ambito di un approccio IATA. Nel caso in cui si dimostri che il metodo di prova h-CLAT non è applicabile ad altre categorie specifiche di sostanze chimiche in esame, è opportuno evitare di utilizzarlo per tali categorie.

5. Come già precisato, il metodo h-CLAT aiuta a distinguere tra sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanei. Tuttavia, esso può contribuire anche alla valutazione della potenza di sensibilizzazione cutanea (4)(5)(9) se utilizzato nell'ambito di approcci integrati quali IATA. Sono tuttavia necessarie ulteriori ricerche, di preferenza basate su dati relativi all'uomo, per determinare in che modo i risultati del metodo h-CLAT possano contribuire alla valutazione della potenza di sensibilizzazione.

6. Le definizioni figurano nell'appendice 1.1.

PRINCIPIO DELLA PROVA

7. Il metodo h-CLAT è una prova *in vitro* che consente di quantificare le variazioni di espressione dei marcatori di superficie cellulare (CD86 e CD54) in una linea cellulare di leucemia monocitica umana (cellule THP-1) dopo 24 ore di esposizione alla sostanza chimica in esame. Tali molecole superficiali sono marcatori tipici dell'attivazione dei monociti THP-1 e possono mimare l'attivazione di DC, che svolge un ruolo cruciale nel *priming* dei linfociti T. Le variazioni di espressione dei marcatori di superficie sono misurate mediante citometria a flusso dopo colorazione cellulare con anticorpi marcati con fluorocromo. In parallelo è inoltre effettuata una misurazione della citotossicità per stabilire se la sovraespressione del marcatore di superficie avviene in presenza di concentrazioni sub-citotossiche. L'intensità di fluorescenza relativa dei marcatori di superficie rispetto al controllo con solvente/disperdente è calcolata e utilizzata in un modello predittivo (cfr. il paragrafo 26) ai fini della distinzione tra sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanei.

DIMOSTRAZIONE DELLA COMPETENZA TECNICA

8. Prima di utilizzare come test di routine la prova descritta nella presente appendice relativa al metodo di prova B.71, i laboratori devono dimostrare le loro competenze tecniche utilizzando le 10 sostanze di riferimento elencate nell'appendice 1.2. Inoltre gli utilizzatori del metodo devono mantenere una banca dati storica contenente i dati ottenuti con i controlli di reattività (cfr. il paragrafo 11) nonché con i controlli positivi e con solvente/disperdente (cfr. i paragrafi 20-22) e utilizzare tali dati per confermare la persistenza nel tempo della riproducibilità della prova nel loro laboratorio.

PROCEDURA

9. La presente prova si basa sul protocollo h-CLAT n. 158 del Servizio dati sui metodi alternativi alla sperimentazione animale (*DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation - DB-ALM*) (18) utilizzato per lo studio di validazione coordinato dal laboratorio di riferimento dell'Unione europea per le alternative alla sperimentazione animale (EURL ECVAM). Si raccomanda di utilizzare questo protocollo nell'applicazione e nell'impiego del metodo h-CLAT in laboratorio. Di seguito è fornita una descrizione degli elementi e delle procedure principali del metodo h-CLAT, che comprende due fasi: la *prova di determinazione della dose* e la *misurazione dell'espressione di CD86/CD54*.

Preparazione delle cellule

10. Per l'esecuzione del metodo h-CLAT si utilizza la linea cellulare di leucemia monocitica umana (THP-1). Si raccomanda che le cellule (TIB-202™) provengano da una banca di cellule riconosciuta, quale la *American Type Culture Collection*.

11. Le cellule THP-1 sono coltivate a 37°C in atmosfera umidificata al 5 % di CO_2, su mezzo di coltura RPMI-1640 integrato da 10 % di siero fetale bovino (FBS), 0,05 mM di 2-mercaptoetanolo, 100 unità/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomicina. L'uso di penicillina e streptomicina nel mezzo di coltura può essere evitato. In tal caso, tuttavia, gli utilizzatori devono verificare che l'assenza di antibiotici nel mezzo di coltura non incida sui risultati, ad esempio testando le sostanze di riferimento indicate nell'appendice 1.2. In ogni caso, per ridurre al minimo il rischio di contaminazione si dovranno seguire buone prassi di coltura cellulare, a prescindere dalla presenza o no di antibiotici nel mezzo di coltura. Le cellule THP-1 sono regolarmente inoculate ogni 2-3 giorni a una densità compresa tra 0,1 e 0,2 × 10^6 cellule/ml e vanno mantenute a densità comprese tra 0,1 e 1,0 × 10^6 cellule/ml. Prima di essere utilizzate per la prova, le cellule devono essere qualificate mediante un controllo di reattività da realizzarsi due settimane dopo lo scongelamento mediante 2,4-dinitroclorobenzene (DNCB) (n. CAS 97-00-7, purezza ≥ 99 %) e solfato di nichel ($NiSO_4$) (n. CAS 10101-97-0, purezza ≥ 99 %) come controlli positivi e acido lattico (LA) (n. CAS 50-21-5, purezza ≥ 85 %) come controllo negativo. Sia il DNCB che il $NiSO_4$ devono produrre una risposta positiva per entrambi i marcatori di superficie cellulare CD86 e CD54; LA deve produrre una risposta negativa per entrambi i marcatori di superficie cellulare CD86 e CD54. Possono essere utilizzate per la prova soltanto le cellule che superano il controllo di reattività. Le cellule possono essere moltiplicate fino a due mesi dopo lo scongelamento senza superare 30 passaggi. Il controllo di reattività va effettuato secondo le procedure descritte ai paragrafi 20-24.

12. Per la prova, le cellule THP-1 sono inoculate a una densità di 0,1 × 10^6 cellule/ml o di 0,2 × 10^6 cellule/ml e precoltivate in fiasche di coltura per 72 o 48 ore rispettivamente. È importante che la densità cellulare nella fiasca di coltura subito dopo il periodo di pre-coltura sia quanto più possibile costante in ogni esperimento (grazie al ricorso a una delle due condizioni di pre-coltura descritte sopra). Infatti, la densità cellulare nella fiasca di coltura subito dopo la pre-coltura può influire sull'espressione di CD86/CD54 indotta da allergeni (19). Il giorno della prova le cellule raccolte dalla fiasca di coltura sono rimesse in sospensione in un nuovo mezzo di coltura a una densità di 2 × 10^6 cellule/ml. Quindi le cellule sono ripartite su una piastra a fondo piatto a 24 pozzetti (500 µl, 1 × 10^6 cellule/pozzetto) o su una piastra a fondo piatto a 96 pozzetti (80 µl, 1,6 × 10^5 cellule/pozzetto).

Prova di determinazione della dose

13. Una *prova di determinazione della dose* è realizzata per determinare il valore CV75, vale a dire la concentrazione della sostanza chimica in esame che produce una vitalità cellulare (CV) del 75 % rispetto al controllo con solvente/disperdente. Il valore CV75 è utilizzato per determinare la concentrazione delle sostanze chimiche in esame per la misurazione dell'espressione di *CD86/CD54* (cfr. i paragrafi 20-24).

Preparazione delle sostanze chimiche in esame e delle sostanze di controllo

14. Le sostanze chimiche in esame e le sostanze di controllo vengono preparate il giorno della prova. Nel metodo h-CLAT le sostanze chimiche in esame sono disciolte o disperse stabilmente (cfr. anche il paragrafo 4) utilizzando di preferenza, come solvente/disperdente, una soluzione salina o un mezzo o, come seconda opzione se la sostanza chimica in esame non è solubile o non forma una dispersione stabile nei due solventi/mezzi disperdenti precedenti, dimetilsulfossido (DMSO, purezza ≥ 99 %), fino a raggiungere una concentrazione finale di 100 mg/ml (nella soluzione salina o nel mezzo) o di 500 mg/ml (nel DMSO). È possibile utilizzare solventi/mezzi disperdenti diversi da quelli descritti sopra fornendo una sufficiente giustificazione scientifica. Si deve tenere conto della stabilità della sostanza chimica in esame nel solvente/disperdente finale.

15. A partire dalle soluzioni madre delle sostanze chimiche in esame (100 mg/ml nella soluzione salina o nel mezzo o 500 mg/ml nel DMSO) si procede alle seguenti diluizioni:

— se il solvente/disperdente è una soluzione salina o un mezzo: vengono preparate otto soluzioni madre (otto concentrazioni) mediante diluizioni doppie in serie realizzate con l'opportuno solvente/disperdente. Queste soluzioni madre sono poi nuovamente diluite di un fattore 50 nel mezzo di coltura (soluzioni di lavoro). Se la concentrazione finale massima di 1 000 µg/ml nella piastra non è tossica occorre determinare nuovamente la concentrazione massima mediante un altro test di citotossicità. La concentrazione finale nella piastra non deve superare 5 000 µg/ml per le sostanze chimiche in esame disciolte o disperse stabilmente in una soluzione salina o un mezzo.

— Se il solvente/disperdente è il DMSO: vengono preparate otto soluzioni madre (otto concentrazioni) mediante diluizioni doppie in serie realizzate con l'opportuno solvente/disperdente. Queste soluzioni madre sono poi nuovamente diluite di un fattore 250 nel mezzo di coltura (soluzioni di lavoro). La concentrazione finale nella piastra non deve superare 1 000 µg/ml, anche se tale concentrazione non è tossica.

Le soluzioni di lavoro sono infine utilizzate per l'esposizione aggiungendo un volume uguale di soluzione di lavoro al volume della sospensione di cellule THP-1 nella piastra (cfr. anche il paragrafo 17) per ottenere un'ulteriore diluizione doppia (generalmente, le concentrazioni finali nella piastra vanno da 7,81 a 1 000 µg/ml).

16. Il controllo con solvente/disperdente utilizzato nel metodo h-CLAT è il mezzo di coltura [per le sostanze chimiche in esame solubilizzate o disperse stabilmente (cfr. il paragrafo 4) nel mezzo o nella soluzione salina] o il DMSO (per le sostanze chimiche in esame solubilizzate o disperse stabilmente nel DMSO) ed è testato a una concentrazione finale unica nella piastra di 0,2 %. Esso è sottoposto alla stessa diluizione descritta per le soluzioni di lavoro al paragrafo 15.

Applicazione delle sostanze chimiche in esame e delle sostanze di controllo

17. Il mezzo di coltura o le soluzioni di lavoro descritti ai paragrafi 15 e 16 sono mescolati nella proporzione 1:1 (v/v) con le sospensioni cellulari preparate nella piastra a fondo piatto a 24 o 96 pozzetti (cfr. il paragrafo 12). Le piastre trattate sono quindi messe in incubazione per 24 ± 0,5 ore a una temperatura di 37°C con il 5 % di CO_2. Si avrà cura di evitare l'evaporazione delle sostanze chimiche volatili in esame nonché la contaminazione incrociata tra i pozzetti da parte delle sostanze stesse, ad esempio sigillando la piastra prima dell'incubazione con le sostanze chimiche in esame (20).

Colorazione con ioduro di propidio (PI)

18. Dopo 24 ± 0,5 ore di esposizione le cellule sono trasferite in provette e raccolte mediante centrifugazione. I supernatanti vengono scartati e le cellule rimanenti sono rimesse in sospensione in 200 µl (in caso di piastra a 96 pozzetti) o 600 µl (in caso di piastra a 24 pozzetti) di tampone fosfato isotonico contenente lo 0,1 % di seroalbumina bovina (tampone di colorazione). 200 µl di sospensione cellulare sono trasferiti in una piastra a fondo rotondo a 96 pozzetti (in caso di piastra a 96 pozzetti) o in una microprovetta (in caso di piastra a 24 pozzetti) e lavati due volte con 200 µl (in caso di piastra a 96 pozzetti) o 600 µl (in caso di piastra a 24 pozzetti) di tampone di colorazione. Infine, le cellule sono rimesse in sospensione nel tampone di colorazione (ad es. 400 µl) ed è aggiunta una soluzione di PI (ad es. 20 µl) (per ottenere, ad esempio, una concentrazione finale di PI di 0,625 µg/ml). È possibile utilizzare altri marcatori di citotossicità, tra cui la 7-aminoactinomicina D (7-AAD) e il blu di tripano, purché si dimostri che tali coloranti alternativi producono risultati simili al PI, ad esempio testando le sostanze di riferimento di cui all'appendice 1.2.

Misurazione della citotossicità mediante citometria a flusso e stima del valore CV75

19. L'assorbimento di PI è analizzato mediante citometria a flusso sul canale di acquisizione FL-3. Vengono complessivamente raccolte 10 000 cellule vive (negative al PI). La vitalità cellulare può essere calcolata dal programma di analisi del citometro mediante l'equazione riportata di seguito. Se la vitalità cellulare è bassa si dovrebbero raccogliere fino a 30 000 cellule, comprese le cellule morte. Un'opzione alternativa consiste nell'acquisire i dati per un minuto dall'inizio dell'analisi.

$$Vitalità\ cellulare = \frac{Numero\ di\ cellule\ vive}{Numero\ totale\ di\ cellule\ analizzate} \times 100$$

Il valore CV75 (cfr. il paragrafo 13), cioè una concentrazione che produce il 75 % di sopravvivenza di cellule THP-1 (25 % di citotossicità), è calcolato per interpolazione log-lineare mediante la seguente equazione:

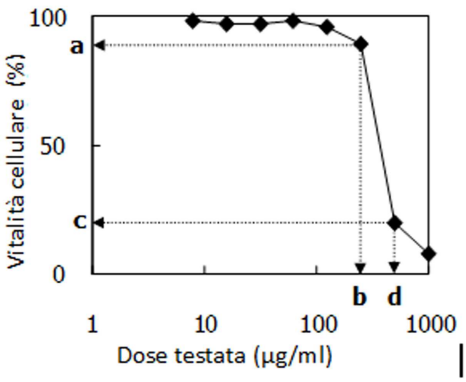
$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

in cui:

a è il valore minimo di vitalità cellulare superiore a 75 %

c è il valore massimo di vitalità cellulare inferiore a 75 %

b e *d* sono le concentrazioni che producono rispettivamente i valori di vitalità cellulare *a* e *c*



È possibile utilizzare altri metodi per calcolare il valore CV75, purché sia provato che ciò non incide sui risultati (ad es. testando le sostanze di riferimento).

Misurazione dell'espressione di CD86/CD54

Preparazione delle sostanze chimiche in esame e delle sostanze di controllo

20. È utilizzato il solvente/disperdente appropriato (soluzione salina, mezzo o DMSO; cfr. il paragrafo 14) per dissolvere le sostanze chimiche in esame o creare una dispersione stabile. Le sostanze chimiche in esame sono dapprima diluite a una concentrazione pari a 100 volte (soluzione salina o mezzo) o 500 volte (DMSO) il valore CV75 × 1,2 determinato nella *prova di determinazione della dose* (cfr. il paragrafo 19). Se non è possibile determinare il valore CV75 (cioè se la tossicità osservata nella *prova di determinazione della dose* non è sufficiente), si utilizzerà come concentrazione inziale la concentrazione solubile o in dispersione stabile più elevata della sostanza chimica in esame preparata con ciascun solvente/disperdente. Si osservi che la concentrazione finale nella piastra non deve superare 5 000 μg/ml (in caso di soluzione salina o mezzo) o 1 000 μg/ml (in caso di DMSO). Vengono quindi effettuate diluizioni in serie di un fattore 1,2 utilizzando il solvente/disperdente corrispondente per ottenere le soluzioni madre [otto concentrazioni comprese tra 100×1,2 × CV75 e 100×0,335 × CV75 (soluzione salina o mezzo) o tra 500×1,2 × CV75 e 500×0,335 × CV75 (DMSO)] che saranno testate con il metodo h-CLAT (per un esempio di schema di dosaggio si veda il protocollo DB-ALM n. 158). Le soluzioni madre sono quindi ulteriormente diluite di un fattore 50 (soluzione salina o mezzo) o 250 (DMSO) nel mezzo di coltura (soluzioni di lavoro). Queste soluzioni di lavoro sono infine utilizzate per l'esposizione, dopo una diluizione finale di fattore 2 nella piastra. Se i risultati non soddisfano i criteri di accettabilità descritti ai paragrafi 29 e 30 per la vitalità cellulare, la *prova di determinazione della dose* può essere ripetuta per calcolare un valore CV75 più preciso. Si osservi che per la misurazione dell'espressione di CD86/CD54 possono essere utilizzate unicamente piastre a 24 pozzetti.

21. Il controllo con solvente/disperdente è preparato come descritto al paragrafo 16. Il controllo positivo utilizzato nel metodo h-CLAT è il DNCB (cfr. il paragrafo 11), di cui si preparano soluzioni madre in DMSO che sono poi diluite come descritto per le soluzioni madre al paragrafo 20. Il DNCB deve essere utilizzato come controllo positivo per la *misurazione dell'espressione di CD86/CD54* a una concentrazione finale unica nella piastra (generalmente 4,0 μg/ml). Per ottenere una concentrazione di 4,0 μg/ml di DNCB nella piastra si prepara una soluzione madre di 2 mg/ml di DNCB in DMSO e la si diluisce ulteriormente di un fattore 250 nel mezzo di coltura fino ad ottenere una soluzione di lavoro di 8 μg/ml. In alternativa è possibile utilizzare, come concentrazione del controllo positivo, il valore CV75 del DNCB determinato in ciascun centro di prova. Altri controlli positivi adeguati possono essere utilizzati in caso di disponibilità di dati storici da cui ricavare criteri di accettabilità comparabili per la batteria di prove. Per i controlli positivi la concentrazione finale nella piastra non deve superare 5 000 μg/ml (in caso di soluzione salina o mezzo) o 1 000 μg/ml (in caso di DMSO). I criteri di accettabilità della batteria di prove sono identici a quelli descritti per la sostanza chimica in esame (cfr. il paragrafo 29), ad eccezione dell'ultimo criterio di accettabilità in quanto il controllo positivo è testato a una concentrazione unica.

Applicazione delle sostanze chimiche in esame e delle sostanze di controllo

22. Per ogni sostanza chimica in esame e sostanza di controllo è necessario un esperimento al fine di ottenere una predizione. Ogni esperimento consiste in almeno due batterie di prove indipendenti per la *misurazione dell'espressione di CD86/CD54* (cfr. i paragrafi 26-28). Le batterie di prove indipendenti hanno luogo in giorni diversi, o nello stesso giorno a condizione che, per ciascuna batteria di prove: a) siano preparate soluzioni madre e soluzioni di lavoro nuove e indipendenti della sostanza chimica in esame e delle soluzioni di anticorpi e b) siano utilizzate cellule raccolte in modo indipendente (cioè provenienti da matracci diversi); tuttavia, le cellule possono provenire dallo stesso passaggio. Le sostanze chimiche in esame e le sostanze di controllo preparate come soluzioni di lavoro (500 μl) sono miscelate con 500 μl di cellule in sospensione ($1x10^6$ cellule) in proporzione di 1:1 e le cellule sono messe in incubazione per 24 ± 0,5 ore come descritto ai paragrafi 20 e 21. Per ogni prova è sufficiente un'unica replica per ciascuna concentrazione della sostanza chimica in esame e della sostanza di controllo, in quanto la predizione è ricavata da almeno due batterie di prove indipendenti.

Colorazione cellulare e analisi

23. Dopo 24 ± 0,5 ore di esposizione le cellule sono trasferite dalla piastra a 24 pozzetti in provette, raccolte per centrifugazione e successivamente lavate due volte con un 1 ml di tampone di colorazione (se necessario possono essere eseguite ulteriori tappe di lavaggio). Dopo il lavaggio le cellule vengono bloccate con 600 μl di soluzione bloccante [tampone di colorazione contenente lo 0,01 % (p/v) di globulina (frazione di Cohn II, III, umana; SIGMA, #G2388-10G o equivalente)] e messe in incubazione a 4°C per 15 minuti. Una volta bloccate le cellule vengono ripartite in tre aliquote da 180 μl su una piastra a fondo rotondo a 96 pozzetti o in una microprovetta.

24. Dopo la centrifugazione le cellule sono sottoposte a colorazione con 50 μl di anticorpi marcati con FITC anti-CD86, anti-CD54 o di anticorpi murini IgG1 (isotipo) a 4°C per 30 minuti. Gli anticorpi descritti nel protocollo h-CLAT n. 158 della banca dati DB-ALM (18) devono essere diluiti in un tampone di colorazione in proporzione di 3:25 v/v [per CD86 (BD-PharMingen, #555657; Clone: Fun-1)] o di 3:50 v/v [per CD54 (DAKO, #F7143; Clone: 6.5B5) e IgG1 (DAKO, #X0927)]. Tali fattori di diluizione degli anticorpi sono stati definiti dagli sviluppatori del metodo di

prova come i fattori che offrono il migliore rapporto segnale-disturbo. Sulla base dell'esperienza degli sviluppatori del metodo di prova, l'intensità di fluorescenza dei vari lotti di anticorpi è generalmente costante. Tuttavia gli utilizzatori possono decidere di effettuare la titolazione degli anticorpi nelle loro condizioni di laboratorio per definire le concentrazioni più adatte all'uso. È possibile avvalersi di altri anticorpi marcati con fluorocromo anti-CD86 e/o anti-CD54 purché si possa dimostrare che essi producono risultati simili agli anticorpi coniugati con FITC, ad esempio testando le sostanze di riferimento di cui all'appendice 1.2. Va osservato che un cambiamento di clone o di fornitore di anticorpi quale descritto nel protocollo h-CLAT n. 158 della banca dati DB-ALM (18) può incidere sui risultati. Dopo essere state lavate due o più volte con 150 µl di tampone di colorazione, le cellule sono rimesse in sospensione in un campione di colorazione (ad es. 400 µl) cui è aggiunta la soluzione di PI (ad es. 20 µl per ottenere una concentrazione finale di 0,625 µg/ml) o di un altro marcatore di tossicità (cfr. il paragrafo 18). I livelli di espressione di CD86 e CD54 e la vitalità cellulare sono analizzati mediante citometria a flusso.

DATI E RELAZIONI

Valutazione dei dati

25. Il livello di espressione di CD86 e CD54 è analizzato mediante citometria a flusso sul canale di acquisizione FL-1. Sulla base della media geometrica dell'intensità di fluorescenza (MFI), l'intensità di fluorescenza relativa (RFI) di CD86 e CD54 per le cellule di controllo positivo (ctrl) e per quelle trattate con la sostanza chimica è calcolata mediante la seguente equazione:

$$RFI = \frac{\begin{array}{c}\textit{MFI delle cellule trattate con la sostanza chimica} - \\ \textit{MFI delle cellule di controllo isotipo trattate con la sostanza chimica}\end{array}}{\begin{array}{c}\textit{MFI delle cellule di controllo trattate con solvente/} \\ \textit{disperdente} - \textit{MFI delle cellule di controllo isotipo trattate con solvente/disperdente}\end{array}} \times 100$$

È inoltre calcolata la vitalità cellulare delle cellule di controllo isotipo (ctrl) [colorate con anticorpi murini IgG1 (isotipo)] mediante l'equazione descritta al paragrafo 19.

Modello predittivo

26. Per la misurazione dell'espressione di *CD86/CD54* ciascuna sostanza chimica è testata in almeno due prove indipendenti per ottenere una predizione unica (POSITIVA o NEGATIVA). Una predizione h-CLAT è considerata POSITIVA se almeno una delle condizioni elencate di seguito è soddisfatta in 2 prove indipendenti su 2 o in almeno 2 prove indipendenti su 3; in caso contrario, la predizione h-CLAT è considerata NEGATIVA (figura 1):

— l'RFI di CD86 è pari o superiore a 150 % in tutte le concentrazioni testate (con una vitalità cellulare ≥ 50 %);

— l'RFI di CD54 è pari o superiore a 200 % in tutte le concentrazioni testate (con una vitalità cellulare ≥ 50 %).

27. Sulla base di quanto precede, se le prime due batterie di prove sono entrambe positive per CD86 e/o sono entrambe positive per CD54, la predizione h-CLAT è considerata POSITIVA e non è necessario eseguire una terza batteria di prove. Analogamente, se le prime due batterie di prove sono negative per entrambi i marcatori, la predizione h-CLAT è considerata NEGATIVA (tenuto conto di quanto disposto al paragrafo 30) e non è necessario eseguire una terza batteria di prove. Tuttavia, se i risultati delle prime due batterie di prove differiscono per almeno uno dei marcatori (CD54 o CD86), è necessario effettuare una terza batteria di prove e la predizione finale sarà basata sul risultato ottenuto nella maggioranza delle tre batterie di prove individuali (cioè 2 su 3). A questo proposito va osservato che se vengono svolte due batterie di prove indipendenti e una di queste è positiva soltanto per CD86 (di seguito, P_1) e l'altra è positiva soltanto per CD54 (di seguito, P_2), è necessario procedere a una terza batteria di prove. Se questa terza batteria di prove è negativa per entrambi i marcatori (di seguito, N), la predizione h-CLAT è considerata NEGATIVA. D'altro canto, se la terza batteria di prove è positiva per uno dei marcatori (P_1 o P_2) o per entrambi i marcatori (di seguito, P_{12}), la predizione h-CLAT è considerata POSITIVA.

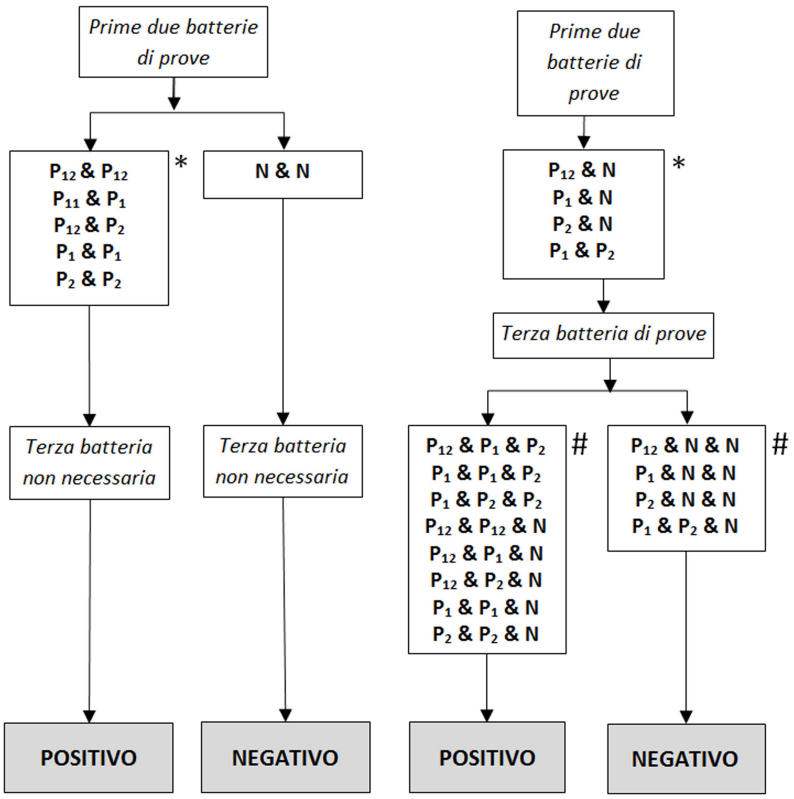


Figura 1: Modello predittivo utilizzato nel metodo di prova h-CLAT. Una predizione h-CLAT va considerata nell'ambito di un approccio IATA e in conformità alle disposizioni dei paragrafi 7 e 8 dell'Introduzione generale.

P_1: prova positiva soltanto per CD86; P_2; prova positiva soltanto per CD54; P_{12}: prova positiva sia per CD86 che per CD54; N: prova non positiva per CD86 né per CD54;

* I riquadri mostrano le combinazioni pertinenti di risultati delle prime due batterie di prove, a prescindere dall'ordine in cui possono essere ottenuti.

I riquadri mostrano le combinazioni pertinenti di risultati delle prime tre batterie di prove sulla base dei risultati ottenuti nelle prime due batterie di prove (riportati nel riquadro che precede), ma non rispecchiano l'ordine in cui possono essere ottenuti.

28. Per le sostanze chimiche in esame per le quali il metodo h-CLAT ha fornito una predizione POSITIVA possono essere eventualmente determinati due valori di concentrazione efficace (EC) (EC150 per CD86 e EC200 per CD54), vale a dire la concentrazione alla quale le sostanze chimiche in esame producono un'RFI di 150 o 200. Tali valori EC potrebbero contribuire alla valutazione della potenza di sensibilizzazione cutanea (9) se utilizzati nell'ambito di approcci integrati quali IATA (4) (5) (6) (7) (8). Essi possono essere calcolati mediante le seguenti equazioni:

$$EC\ 150\ (per\ CD86) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC\ 200\ (per\ CD86) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

in cui

A_{conc} è la concentrazione più bassa in µg/ml con RFI < 150 (CD86) o 200 (CD54)

B_{conc} è la concentrazione più elevata in µg/ml con RFI > 150 (CD86) o 200 (CD54)

A_{RFI} è l'RFI alla concentrazione più bassa in µg/ml con RFI < 150 (CD86) o 200 (CD54)

B_{RFI} è l'RFI alla concentrazione più elevata in µg/ml con RFI > 150 (CD86) o 200 (CD54)

Per determinare con maggior precisione i valori EC150 e EC200 possono essere necessarie tre prove indipendenti di *misurazione dell'espressione di CD86/CD54*. I valori finali EC150 e EC200 sono quindi determinati come mediana delle EC calcolate sulla base delle tre batterie di prove indipendenti. Se solo due delle tre batterie di prove indipendenti soddisfano i criteri di positività (cfr. i paragrafi 26-27) viene adottato il valore EC150 o EC200 più elevato tra i due valori calcolati.

Criteri di accettabilità

29. I seguenti criteri di accettabilità devono essere soddisfatti quando si utilizza il metodo di prova h-CLAT (22) (27).

— I valori di vitalità cellulare dei controlli con mezzo e con solvente/disperdente devono essere superiori a 90 %.

— Nel controllo con solvente/disperdente i valori RFI di CD86 e CD54 non devono superare i criteri di positività (CD86 RFI ≥ 150 % e CD54 RFI ≥ 200 %). I valori RFI del controllo con solvente/disperdente sono calcolati mediante la formula descritta al paragrafo 25 [sostituendo "MFI della sostanza chimica" con "MFI del solvente/disperdente" e "MFI del solvente/disperdente" con "MFI del controllo (mezzo)"].

— Per entrambi i controlli (mezzo e solvente/disperdente) il rapporto MFI CD86-controllo isotipo e MFI CD54-controllo isotipo deve essere > 105 %.

— Nel controllo positivo (DNCB) i valori RFI di CD86 e CD54 devono soddisfare i criteri di positività (CD86 RFI ≥ 150 e CD54 RFI ≥ 200) e la vitalità cellulare deve essere superiore a 50 %.

— Per la sostanza chimica in esame la vitalità cellulare deve essere superiore a 50 % in almeno quattro concentrazioni testate in ciascuna batteria di prove.

30. Un risultato negativo è accettabile soltanto per le sostanze chimiche in esame che presentano una vitalità cellulare inferiore a 90 % alla massima concentrazione testata (cioè 1,2 × CV75 in base allo schema di diluizione in serie descritto al paragrafo 20). Se la vitalità cellulare a 1,2 × CV75 è pari o superiore a 90 % il risultato negativo non deve essere preso in considerazione. In tal caso si raccomanda di cercare di migliorare la scelta delle dosi ripetendo la determinazione del valore CV75. Va osservato che ove si utilizzi una concentrazione di 5 000 µg/ml in soluzione salina (o mezzo o altri solventi/disperdenti), una concentrazione di 1 000 µg/ml in DMSO o la concentrazione massima di solubilità come concentrazione massima di prova di una sostanza chimica in esame, un risultato negativo è accettabile anche in presenza di una vitalità cellulare superiore a 90 %.

Relazione sulla prova

31. La relazione sulla prova comprende le informazioni riportate di seguito.

Sostanza chimica in esame

Sostanza monocostituente:

— identificazione della sostanza chimica: denominazioni quali i nomi IUPAC o CAS, i numeri CAS, il codice SMILES o InChI, la formula di struttura e/o altri identificatori;

— aspetto fisico, Log K_{ow}, idrosolubilità, solubilità nel DMSO, peso molecolare e proprietà fisico-chimiche pertinenti aggiuntive, a seconda dei dati disponibili;

— purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico, ecc.;

— trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione);

— concentrazione/i testata/e;

— condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;

— motivazione della scelta del solvente/disperdente per ciascuna sostanza chimica in esame.

Sostanza multicostituente, UVCB o miscela:

— caratterizzazione, nella misura del possibile, ad esempio attraverso l'identità chimica (cfr. sopra), la purezza, le proporzioni quantitative e le proprietà fisico-chimiche pertinenti (cfr. sopra) dei costituenti, secondo i dati disponibili;

— aspetto fisico, idrosolubilità, solubilità nel DMSO e proprietà fisico-chimiche pertinenti aggiuntive, a seconda dei dati disponibili;

— peso molecolare o peso molecolare apparente nel caso di miscele/polimeri di composizione nota o altre informazioni pertinenti per la realizzazione dello studio;

— trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione);

— concentrazione/i testata/e;

— condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;

— motivazione della scelta del solvente/disperdente per ciascuna sostanza chimica in esame.

Controlli

Controllo positivo

— identificazione della sostanza chimica: denominazioni quali i nomi IUPAC o CAS, i numeri CAS, il codice SMILES o InChI, la formula di struttura e/o altri identificatori;

— aspetto fisico, Log K_{ow}, idrosolubilità, solubilità nel DMSO, peso molecolare e proprietà fisico-chimiche pertinenti aggiuntive, se del caso e a seconda dei dati disponibili;

— purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico, ecc.;

— trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione);

— concentrazione/i testata/e;

— condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;

— riferimento ai dati storici relativi ai controlli positivi che dimostrano la conformità ai criteri di accettabilità, se del caso.

Controllo negativo e controllo con solvente/disperdente

— identificazione della sostanza chimica: denominazioni quali i nomi IUPAC o CAS, i numeri CAS, il codice SMILES o InChI, la formula di struttura e/o altri identificatori;

— purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico, ecc.;

— aspetto fisico, peso molecolare e altre proprietà fisico-chimiche pertinenti, nel caso siano utilizzati solventi/mezzi disperdenti diversi da quelli menzionati nelle linee guida e se disponibili;

— condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;

— motivazione della scelta del solvente/disperdente per ciascuna sostanza chimica in esame.

Condizioni della prova

— nome e indirizzo dello sponsor, dell'infrastruttura utilizzata per la prova e del responsabile dello studio;

— descrizione della prova utilizzata

— linea cellulare utilizzata, condizioni di conservazione e provenienza (ad esempio, l'infrastruttura dalla quale provengono le cellule);

— tipo di citometria a flusso utilizzato (ad es. modello), comprese le impostazioni dello strumento, globulina, anticorpi e marcatore di citotossicità utilizzati;

— procedura utilizzata per dimostrare la competenza del laboratorio nell'esecuzione della prova mediante sostanze di riferimento o nel dimostrare la riproducibilità della prova nel tempo, ad esempio dati storici dei controlli e/o dei controlli di reattività.

Criteri di accettabilità della prova:

— vitalità cellulare, valori MFI e RFI ottenuti con il controllo con solvente/disperdente rispetto agli intervalli di accettabilità;

— vitalità cellulare e valori RFI ottenuti con il controllo positivo rispetto agli intervalli di accettabilità;

— vitalità cellulare di tutte le concentrazioni testate della sostanza chimica in esame.

Procedura

— numero di prove realizzate;

— concentrazioni della sostanza chimica in esame, applicazione e tempo di esposizione (se diverso da quello raccomandato);

— descrizione dei criteri di valutazione e di decisione impiegati;

— descrizione di qualsiasi modifica della procedura sperimentale.

Risultati

— presentazione dei dati in formato tabulare, ivi compreso CV75 (se del caso), MFI geometrica individuale, RFI, valori di vitalità cellulare, valori EC150/EC200 (se del caso) ottenuti per la sostanza chimica in esame e per il controllo positivo in ciascuna batteria di prove, e indicazione della classificazione della sostanza chimica in esame secondo il modello predittivo;

— descrizione di eventuali altre osservazioni pertinenti, se del caso.

Discussione dei risultati

— discussione dei risultati ottenuti con il metodo di prova h-CLAT;

— esame dei risultati della prova nel quadro di un approccio di tipo IATA, qualora siano disponibili altre informazioni pertinenti.

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

(1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. Toxicol. *In Vitro* 20, 767-773.

(2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. Toxicol. *In Vitro* 21, 428-437.

(3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Consultabile al seguente indirizzo: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. J Appl Toxicol. 35, 1318-1332.

(5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. J Appl Toxicol. 35, 1333-1347.

(6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potencials. Regul Toxicol Parmacol. 63, 489-504.

(7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol. 69, 371-379.

(8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Parmacol. 71, 337-351.

(9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. Arch Toxicol. 89, 2355-2383.

(10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. J Appl Toxicol. DOI 10.1002/jat.3281.

(11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. Toxicol. *In Vitro* 26, 1150-60.

(12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Consultabile al seguente indirizzo: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing

(13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report consultabile al seguente indirizzo: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. J. Toxicol. Sci. 38, 599-609.

(15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

(16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch Toxicol 87, 1683-1969.

(17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6^{th} report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.

(18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Consultabile al seguente indirizzo: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

(19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamato K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.

(20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7^{th} report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.

(21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Parigi, Francia, 2005, 96 pp.

(22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Consultabile al seguente indirizzo: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En

(23) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Consultabile al seguente indirizzo: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).

(25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

Appendice 1.1

DEFINIZIONI

Accuratezza: grado di concordanza tra i risultati ottenuti con la prova e i valori di riferimento comunemente accettati. Misura l'efficienza della prova e costituisce un aspetto della pertinenza. Il termine è spesso utilizzato come sinonimo di "concordanza", per indicare la proporzione di risultati corretti di una prova (21).

AOP (*Adverse Outcome Pathway*, meccanismo d'azione degli effetti avversi): sequenza di eventi che, a partire dalla struttura chimica di una sostanza chimica bersaglio o di un gruppo di sostanze chimiche simili, attraverso l'evento molecolare scatenante, produce un effetto avverso *in vivo* (22).

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

CV75: concentrazione stimata che presenta una vitalità cellulare del 75 %.

EC150: concentrazioni che producono RFI di 150 per l'espressione di CD86.

EC200: concentrazioni che producono RFI di 200 per l'espressione di CD54.

Citometria a flusso: tecnica citometrica in cui le cellule sospese in un fluido passano velocemente e singolarmente attraverso un fascio luminoso di eccitazione, producendo schemi di diffusione della luce che sono caratteristici delle cellule e dei loro componenti; le cellule sono spesso marcate con marcatori fluorescenti di modo che la luce sia dapprima assorbita e quindi emessa a un'altra frequenza.

Pericolo: proprietà intrinseca di un agente o di una situazione che ha il potenziale di causare effetti nocivi se un organismo, un sistema o una (sotto-)popolazione vi sono esposti.

IATA (*Integrated Approaches to Testing and Assessment*, approcci integrati in materia di prove e valutazioni): approccio strutturato utilizzato per l'identificazione del pericolo (potenziale), la caratterizzazione del pericolo (potenza) e/o la valutazione della sicurezza (potenziale/potenza ed esposizione) di una sostanza chimica o di un gruppo di sostanze chimiche, che integra in modo strategico e ponderato tutti i dati pertinenti per orientare una decisione di tipo regolamentare concernente il pericolo potenziale e/o il rischio e/o la necessità di effettuare altre prove mirate e, pertanto, limitate allo stretto necessario.

Controllo con mezzo: una replica non trattata che contiene tutti i componenti di un sistema di prova. Questo campione subisce il medesimo procedimento dei campioni trattati con la sostanza chimica in esame e di altri campioni di controllo al fine di determinare se il solvente/disperdente interagisce con il sistema di prova.

Miscela: una miscela o una soluzione composta di due o più sostanze.

Sostanza monocostituente: sostanza, definita attraverso la sua composizione quantitativa, in cui un costituente principale è presente in percentuale pari ad almeno 80 % (p/p).

Sostanza multicostituente: sostanza, definita attraverso la sua composizione quantitativa, in cui più costituenti principali sono presenti in concentrazione ≥ 10 % (p/p) e < 80 % (p/p). Una sostanza multicostituente è il risultato di un processo di fabbricazione. La differenza tra miscela e sostanza multicostituente è che una miscela è ottenuta attraverso la miscelazione di due o più sostanze senza che avvenga una reazione chimica. Una sostanza multicostituente è il risultato di una reazione chimica.

Controllo positivo: replica contenente tutti i componenti di un sistema di prova, trattata con una sostanza che notoriamente induce una risposta positiva. Perché sia possibile valutare la variabilità nel tempo della risposta del controllo positivo, l'intensità di tale risposta non dovrebbe essere eccessiva.

Preapteni: sostanze chimiche attivate tramite trasformazione abiotica.

Proapteni: sostanze chimiche che necessitano di una bioattivazione enzimatica per dispiegare il loro potenziale di sensibilizzazione cutanea.

Intensità di fluorescenza relativa (RFI): valore relativo della media geometrica dell'intensità di fluorescenza (MFI) delle cellule esposte alla sostanza chimica in esame confrontato con l'MFI di cellule trattate con solvente/disperdente.

Pertinenza: descrizione del rapporto tra la prova e l'effetto ricercato; indica se la prova è significativa e utile per uno scopo specifico. È il grado con cui la prova misura o prevede correttamente l'effetto biologico di interesse. La pertinenza comprende una valutazione dell'accuratezza (concordanza) di una prova (21).

Affidabilità: misura in cui una prova può essere riprodotta nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi utilizzando il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità interna ai laboratori e la ripetibilità fra i laboratori (21).

Batteria di prove: una batteria di prove consiste nel testare una o più sostanze chimiche in esame simultaneamente a un controllo con solvente/disperdente e a un controllo positivo.

Sensibilità: proporzione di tutte le sostanze chimiche positive/attive correttamente classificate dalla prova. Misura l'accuratezza di una prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di una prova (21).

Tampone di colorazione: tampone fosfato salino contenente 0,1 % di albumina di siero bovino.

Controllo con solvente/disperdente: campione non trattato contenente tutti i componenti di un sistema di prova, esclusa la sostanza chimica in esame, ma incluso il solvente/disperdente utilizzato. È utilizzato per stabilire la risposta di base per i campioni trattati con la sostanza chimica in esame disciolta o in dispersione stabile nello stesso solvente/disperdente. Se testato in concomitanza con un controllo con mezzo, questo campione dimostra anche se il solvente/disperdente interagisce con il sistema di prova.

Specificità: proporzione di tutte le sostanze chimiche negative/inattive correttamente classificate dalla prova. Misura l'accuratezza di una prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di una prova (21).

Sostanza: un elemento chimico e i suoi composti, allo stato naturale od ottenuti per mezzo di un procedimento di produzione, compresi gli additivi necessari a mantenerne la stabilità e le impurità derivanti dal procedimento utilizzato, ma esclusi i solventi che possono essere separati senza compromettere la stabilità della sostanza o modificarne la composizione.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata applicando il presente metodo di prova.

Sistema globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (UN GHS): sistema di classificazione delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) secondo tipi e livelli standardizzati di rischio fisico, sanitario e ambientale, che elabora i relativi elementi di comunicazione, quali pittogrammi, avvertenze, indicazioni di pericolo, consigli di prudenza e schede informative di sicurezza, per trasmettere informazioni sugli effetti avversi di dette sostanze a tutela delle persone (compresi datori di lavoro, lavoratori, trasportatori, consumatori e personale di pronto intervento) e dell'ambiente (23).

UVCB: sostanze la cui composizione non è conosciuta o è variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali origine biologica.

Metodo di prova valido: metodo di prova la cui pertinenza e affidabilità sono ritenute soddisfacenti per uno scopo specifico e che si fonda su principi scientificamente provati. Un metodo di prova non è mai valido in assoluto ma solo in relazione a un determinato scopo (21).

Appendice 1.2

SOSTANZE CHIMICHE PER LA VERIFICA DELLA COMPETENZA TECNICA

Prima di utilizzare come test di routine la prova descritta nella presente appendice per il metodo di prova B.71, i laboratori sono tenuti a dimostrare la loro competenza tecnica ottenendo correttamente la predizione attesa con il metodo h-CLAT per le 10 sostanze raccomandate nella tabella 1 e ottenendo valori CV75, EC150 e EC200 che rientrino nel rispettivo intervallo di riferimento per almeno 8 delle 10 sostanze di riferimento. Tali sostanze sono state selezionate per rappresentare la gamma di risposte per quanto riguarda i pericoli di sensibilizzazione cutanea. Altri criteri di selezione riguardavano la disponibilità in commercio delle sostanze e la disponibilità di dati di riferimento *in vivo* e di dati *in vitro* di elevata qualità ottenuti con il metodo h-CLAT. Sono inoltre disponibili dati di riferimento pubblicati per il metodo h-CLAT (3) (14).

Tabella 1

Sostanze raccomandate per la verifica della competenza tecnica con il metodo h-CLAT

Sostanze di prova per la verifica della competenza	N. CAS	Stato fisico	Predizione *in vivo* [1]	Intervallo di riferimento CV75 in µg/ml [2]	Risultati h-CLAT per CD86 (intervallo di riferimento EC150 in µg/ml) [2]	Risultati h-CLAT per CD54 (intervallo di riferimento EC200 in µg/ml) [2]
2,4-Dinitroclorobenzene	97-00-7	Solido	Sensibilizzante (estremamente elevato)	2-12	Positivo (0,5-10)	Positivo (0,5-15)
4-Fenilendiammina	106-50-3	Solido	Sensibilizzante (elevato)	5-95	Positivo (<40)	Negativo (>1,5) [3]
Solfato di nichel	10101-97-0	Solido	Sensibilizzante (moderato)	30-500	Positivo (<100)	Positivo (10-100)
2-Mercaptobenzotiazolo	149-30-4	Solido	Sensibilizzante (moderato)	30-400	Negativo (>10) [3]	Positivo (10-140)
R(+)-Limonene	5989-27-5	Liquido	Sensibilizzante (debole)	>20	Negativo (>5) [3]	Positivo (<250)
Imidazolidinil urea	39236-46-9	Solido	Sensibilizzante (debole)	25-100	Positivo (20-90)	Positivo (20-75)
Isopropanolo	67-63-0	Liquido	Non sensibilizzante	>5 000	Negativo (>5 000)	Negativo (>5 000)
Glicerolo	56-81-5	Liquido	Non sensibilizzante	>5 000	Negativo (>5 000)	Negativo (>5 000)
Acido lattico	50-21-5	Liquido	Non sensibilizzante	1500-5 000	Negativo (>5 000)	Negativo (>5 000)
Acido 4-amminobenzoico	150-13-0	Solido	Non sensibilizzante	>1 000	Negativo (>1 000)	Negativo (>1 000)

Abbreviazioni: N. CAS (<*Chemical Abstracts Service Registry Number*) = Numero CAS (numero di registrazione nell'inventario europeo delle sostanze chimiche).

[1] La predizione *in vivo* del pericolo (e della potenza) è basata su dati LLNA (3) (14). La potenza *in vivo* è determinata mediante criteri proposti da ECETOC (24).

[2] Sulla base dei dati storici osservati (13) (25).

[3] Storicamente la maggioranza dei dati ottenuti per questo marcatore era negativa, per cui ci si aspetta per lo più un risultato negativo. L'intervallo indicato è stato definito sulla base dei pochi risultati storici positivi osservati. Se si ottiene un risultato positivo il valore EC deve essere compreso nell'intervallo di riferimento indicato.

Appendice 2

SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA *IN VITRO*: TEST DI ATTIVAZIONE DELLA LINEA CELLULARE U937 - (U-SENS™)

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

1. Il metodo U-SENS™ consente di quantificare la variazione di espressione di un marcatore di superficie cellulare associato al processo di attivazione di monociti e cellule dendritiche (DC) (cioè CD86) nella linea cellulare di linfoma istiocitico umano U937 in seguito all'esposizione a sensibilizzanti (1). I livelli misurati di espressione del marcatore di superficie cellulare CD86 nella linea cellulare U937 sono quindi utilizzati per contribuire a distinguere tra sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanei.

2. Il metodo U-SENS™ è stato oggetto di uno studio di validazione (2) coordinato da L'Oreal e di una successiva revisione indipendente *inter pares* effettuata sotto la guida del comitato scientifico consultivo (ESAC) del laboratorio di riferimento dell'Unione europea per le alternative alla sperimentazione animale (*European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing - EURL ECVAM*) (3). Tenuto conto di tutti i dati disponibili e dei pareri formulati dalle autorità di regolamentazione e dai portatori di interessi, l'EURL ECVAM ha raccomandato l'uso del metodo U-SENS™ (4) nell'ambito di una metodologia integrata di tipo IATA per contribuire a distinguere tra sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanei a fini di classificazione ed etichettatura del pericolo. Nel suo documento orientativo sull'elaborazione di relazioni riguardanti approcci strutturati di integrazione dei dati e uso di fonti individuali di informazioni nell'ambito dell'approccio IATA per la sensibilizzazione cutanea, l'OCSE analizza una serie di studi di caso e descrive differenti strategie di prova e modelli predittivi. Uno degli approcci definiti si basa sul metodo di prova U-SENS (5). Esistono inoltre in letteratura (4)(5)(7) esempi dell'uso dei dati U-SENS™ in combinazione con altre informazioni, compresi dati storici e dati umani validi preesistenti (6).

3. È stato dimostrato che il metodo U-SENS™ può essere applicato in laboratori con esperienza nel campo delle tecniche di coltura cellulare e dell'analisi mediante citometria a flusso. Il livello di riproducibilità atteso delle predizioni è dell'ordine del 90 % a livello intralaboratorio e dell'84 % a livello interlaboratori (8). I risultati dello studio di validazione (8) e di altri studi pubblicati (1) indicano globalmente che, rispetto ai risultati ottenuti con l'LLNA, l'accuratezza nella distinzione tra sensibilizzanti cutanei (categoria 1 del GHS dell'ONU/CLP) e non sensibilizzanti è pari all'86 % (N=166) per una sensibilità del 91 % (118/129) e una specificità del 65 % (24/37). Rispetto ai risultati ottenuti nell'uomo, l'accuratezza nella distinzione tra sensibilizzanti cutanei (categoria 1 del GHS dell'ONU/CLP) e non sensibilizzanti è pari al 77 % (N=101) per una sensibilità del 100 % (58/58) e una specificità del 47 % (20/43). Rispetto all'LLNA, è più probabile che i falsi negativi nelle predizioni formulate con il metodo U-SENS™ riguardino sostanze chimiche con una potenza di sensibilizzazione cutanea da bassa a moderata (sottocategoria 1B del GHS dell'ONU/CLP) piuttosto che sostanze chimiche con una potenza di sensibilizzazione cutanea elevata (sottocategoria 1A del GHS dell'ONU/CLP) (1)(8)(9). L'insieme di queste informazioni indica l'utilità del metodo di prova U-SENS™ come elemento in grado di contribuire all'identificazione dei pericoli di sensibilizzazione cutanea. Tuttavia, i valori di accuratezza forniti in questa sede per il metodo U-SENS™ utilizzato isolatamente sono puramente indicativi, in quanto la prova dovrebbe essere considerata in combinazione con altre fonti di informazione nell'ambito di un approccio IATA e in conformità alle disposizioni dei paragrafi 7 e 8 dell'Introduzione generale. Inoltre, nel valutare i metodi di studio della sensibilizzazione cutanea che non utilizzano la sperimentazione animale si deve tenere presente che l'LLNA, come pure altre prove che utilizzano la sperimentazione animale, può non riflettere pienamente la situazione per l'uomo.

4. I dati attualmente disponibili mostrano che il metodo di prova U-SENS™ è applicabile a sostanze chimiche in esame (compresi ingredienti di cosmetici quali conservanti, tensioattivi, sostanze attive, coloranti) che coprono diversi gruppi funzionali organici, proprietà fisico-chimiche, potenze di sensibilizzazione cutanea (determinate nell'ambito di studi in *in vivo*) e l'insieme dei meccanismi di reazione notoriamente associati alla sensibilizzazione cutanea (accettore di Michael, sintesi di una base di Schiff, agente acilante, sostituzione nucleofila bimolecolare [SN2], o sostituzione nucleofila aromatica [SNAr]) (1)(8)(9)(10). Il metodo di prova U-SENS™ è applicabile alle sostanze chimiche solubili o che formano una dispersione stabile (colloide o sospensione in cui la sostanza chimica in esame non si deposita né si separa dal solvente/mezzo disperdente formando più fasi) in un solvente/disperdente idoneo (cfr. il paragrafo 13). Le sostanze chimiche della banca dati classificate come preapteni (sostanze attivate mediante ossidazione) o proapteni (sostanze che richiedono un'attivazione enzimatica, ad esempio mediante enzimi P450) sono state correttamente identificate con il metodo U-SENS™ (1) (10). Le sostanze chimiche in grado di provocare la rottura della membrana possono dar luogo a falsi positivi a causa di un aumento non specifico dell'espressione di

CD86. In effetti, 3 dei 7 falsi positivi in relazione alla classificazione di riferimento *in vivo* erano tensioattivi (1). Pertanto risultati positivi con tensioattivi vanno considerati con cautela, mentre risultati negativi con tensioattivi possono essere utilizzati nel processo di identificazione della sostanza chimica in esame come non sensibilizzante. Le sostanze chimiche fluorescenti possono essere valutate con il metodo U-SENS™ (1); tuttavia, le sostanze chimiche fortemente fluorescenti che emettono alla stessa lunghezza d'onda dell'isotiocianato di fluorescina (FITC) o dello ioduro di propidio (PI) interferiscono con la rilevazione mediante citometria a flusso e pertanto non possono essere correttamente valutate mediante anticorpi coniugati con FITC (rischio di falso negativo) o PI (vitalità non misurabile). In questo caso si può fare ricorso, rispettivamente, ad altri anticorpi marcati con fluorocromo o ad altri marcatori di citotossicità, purché si possa dimostrare, ad esempio testando le sostanze di riferimento indicate nell'appendice 2.2, che essi producono risultati simili agli anticorpi marcati con FITC o PI (cfr. il paragrafo 18). Alla luce di quanto precede, i risultati positivi con tensioattivi e i risultati negativi con sostanze chimiche fortemente fluorescenti andranno interpretati nel contesto dei limiti indicati e in combinazione con altre fonti di informazione nell'ambito di un approccio IATA. Nel caso in cui si dimostri che il metodo di prova U-SENS™ non è applicabile ad altre categorie specifiche di sostanze chimiche in esame, è opportuno evitare di utilizzarlo per tali categorie.

5. Come già precisato, il metodo U-SENS™ aiuta a distinguere tra sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanei. Tuttavia, esso può contribuire anche alla valutazione della potenza di sensibilizzazione cutanea se utilizzato nell'ambito di approcci integrati quali IATA. Sono però necessarie ulteriori ricerche, di preferenza basate su dati relativi all'uomo, per determinare in che modo i risultati del metodo U-SENS™ possano contribuire alla valutazione della potenza di sensibilizzazione.

6. Le definizioni figurano nell'appendice 2.1.

Principio Della Prova

7. Il metodo U-SENS™ è una prova *in vitro* che consente di quantificare le variazioni di espressione del marcatore di superficie cellulare CD86 nella linea cellulare di linfoma istiocitico umano (cellule U937) dopo 45 ± 3 ore di esposizione alla sostanza chimica in esame. Il marcatore di superficie CD86 è un marcatore tipico dell'attivazione delle cellule U937. Si tratta di una molecola di costimolazione capace di stimolare l'attivazione monocitaria, che svolge un ruolo cruciale nel priming dei linfociti T. Le variazioni di espressione del marcatore di superficie cellulare CD86 sono misurate mediante citometria a flusso dopo colorazione cellulare, generalmente effettuata con anticorpi marcati con isotiocianato di fluorescina (FITC). In parallelo è inoltre effettuata una misurazione della citotossicità (ad esempio mediante PI) per stabilire se la sovraespressione del marcatore di superficie cellulare CD86 avviene in presenza di concentrazioni sub-citotossiche. L'indice di stimolazione (S.I.) del marcatore di superficie cellulare CD86 rispetto al controllo con solvente/disperdente è calcolato e utilizzato in un modello predittivo (cfr. il paragrafo 19) ai fini della distinzione tra sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanei.

Dimostrazione Della Competenza Tecnica

8. Prima di utilizzare come test di routine la prova descritta nella presente appendice relativa al metodo di prova B.71, i laboratori devono dimostrare le loro competenze tecniche utilizzando le 10 sostanze di riferimento elencate nell'appendice 2.2, conformemente alle buone pratiche per i metodi *in vitro* (11). Inoltre gli utilizzatori del metodo devono mantenere una banca dati storica contenente i dati ottenuti con i controlli di reattività (cfr. il paragrafo 11) nonché con i controlli positivi e con solvente/disperdente (cfr. i paragrafi 15-16) e utilizzare tali dati per confermare la persistenza nel tempo della riproducibilità della prova nel loro laboratorio.

Procedura

9. La presente prova si basa sul protocollo U-SENS™ n. 183 del Servizio dati sui metodi alternativi alla sperimentazione animale (*DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation - DB-ALM*) (12). Nell'applicare e utilizzare la prova U-SENS™ in laboratorio vanno seguite le procedure operative standard (SOP). È possibile avvalersi di un sistema automatizzato per l'esecuzione della prova U-SENS™ purché si dimostri, ad esempio testando le sostanze di riferimento di cui all'appendice 2.2, che tale sistema produce risultati simili. Di seguito è fornita una descrizione dei principali elementi e procedure del metodo U-SENS™.

Preparazione delle cellule

10. Per l'esecuzione del metodo U-SENS™ si utilizza la linea cellulare di linfoma istiocitico umano (cellule U937) (13). Le cellule (clone CRL1593.2) devono provenire da una banca di cellule riconosciuta, quale la *American Type Culture Collection*.

11. Le cellule U937 sono coltivate a 37°C in atmosfera umidificata al 5 % di CO_2, su mezzo di coltura RPMI-1 640 integrato da 10 % di siero fetale di vitello (FCS), 2 mM di L-glutammina, 100 unità/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomicina (mezzo completo). Le cellule U937 sono regolarmente messe in subcultura ogni 2-3 giorni a una densità di 1,5 o 3 × 10^5 cellule/ml rispettivamente. La densità cellulare non deve superare 2 × 10^6 cellule/ml e la vitalità cellulare misurata con esclusione del blu di tripano deve essere ≥ 90 % (questo non si applica al primo passaggio successivo allo scongelamento). Prima di essere utilizzato per la prova, ogni lotto di cellule, FCS o anticorpi deve essere qualificato mediante un controllo di reattività da realizzarsi almeno una settimana dopo lo scongelamento mediante acido picrilsulfonico (acido 2,4,6-trinitrobenzensulfonico: TNBS) (n. CAS 2 508-19-2, purezza ≥ 99 %) come controllo positivo e acido lattico (LA) (n. CAS 50-21-5, purezza ≥ 85 %) come controllo negativo. Per il controllo di reattività devono essere testate sei concentrazioni finali per ciascuno dei due controlli (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100µg/ml e LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200µg/ml). Il TNBS solubilizzato nel mezzo completo deve dar luogo a una risposta di CD86 positiva e correlata alla concentrazione (ad es. quando una concentrazione positiva, S.I. CD86 ≥ 150, è seguita da una concentrazione con S.I. CD86 crescente) e l'acido lattico solubilizzato nel mezzo completo deve dar luogo a una risposta negativa di CD86 (cfr. il paragrafo 21). Possono essere utilizzati per la prova soltanto i lotti di cellule che superano per due volte il controllo di reattività. Le cellule possono essere moltiplicate fino a sette settimane dopo lo scongelamento senza superare 21 passaggi. Il controllo di reattività va effettuato secondo le procedure descritte ai paragrafi 18-22.

12. Per la prova, le cellule U937 sono inoculate a una densità di 3 × 10^5 cellule/ml o di 6 × 10^5 cellule/ml e precoltivate in fiasche di coltura per 2 giorni o 1 giorno rispettivamente. Possono essere utilizzate condizioni di precoltura diverse da quelle descritte sopra purché si forniscano sufficienti motivazioni scientifiche e si dimostri, ad esempio testando le sostanze di riferimento di cui all'appendice 2.2, che tali condizioni alternative producono risultati simili. Il giorno della prova le cellule raccolte dalla fiasca di coltura sono rimesse in sospensione in un nuovo mezzo di coltura a una densità di 5 × 10^5 cellule/ml. Quindi le cellule sono ripartite su una piastra a fondo piatto a 96 pozzetti con 100 µl (densità cellulare finale di 0,5 × 10^5 cellule/pozzetto).

Preparazione delle sostanze chimiche in esame e delle sostanze di controllo

13. La valutazione della solubilità è realizzata prima dell'esecuzione della prova. A questo scopo le sostanze chimiche in esame sono dissolte o disperse stabilmente a una concentrazione di 50 mg/ml utilizzando di preferenza come solvente il mezzo completo o, se la sostanza chimica in esame non è solubile nel mezzo completo, dimetilsulfossido (DMSO, purezza ≥ 99 %) come seconda scelta di solvente/disperdente. Per la prova, la sostanza chimica in esame è disciolta fino a una concentrazione finale di 0,4 mg/ml nel mezzo completo, se la sostanza è solubile in tale solvente/disperdente. Se è solubile unicamente in DMSO, la sostanza chimica è disciolta a una concentrazione di 50 mg/ml. È possibile utilizzare solventi/mezzi disperdenti diversi da quelli descritti sopra fornendo una sufficiente giustificazione scientifica. Si deve tenere conto della stabilità della sostanza chimica in esame nel solvente/disperdente finale.

14. Le sostanze chimiche in esame e le sostanze di controllo vengono preparate il giorno della prova. Poiché non viene effettuata una prova di determinazione della dose, per la prima batteria di prove vengono testate 6 concentrazioni finali (1, 10, 20, 50, 100 e 200 µg/ml) nel corrispondente solvente/disperdente, vale a dire mezzo completo o DMSO a 0,4 % nel mezzo. Per le batterie di prove successive, a partire dalle soluzioni delle sostanze chimiche in esame alla concentrazione di 0,4 mg/ml nel mezzo completo o 50 mg/ml in DMSO vengono preparate almeno 4 soluzioni di lavoro (cioè almeno 4 concentrazioni) con il solvente/disperdente corrispondente. Le soluzioni di lavoro sono infine utilizzate per il trattamento aggiungendo un volume uguale di sospensione di cellule U937 (cfr. il paragrafo 11 *supra*) al volume della soluzione di lavoro nella piastra per ottenere un'ulteriore diluizione di fattore 2 (12). Le concentrazioni (almeno 4) per eventuali batterie di prove supplementari sono scelte sulla base dei risultati individuali di tutte le batterie di prove precedenti (8). Le concentrazioni finali utilizzabili sono 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12.5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 e 200 µg/ml. La concentrazione finale massima è 200 µg/ml. Se si ottiene un valore positivo per CD86 a 1 µg/ml, si valuta 0,1 µg/ml per trovare la concentrazione della sostanza chimica in esame che non supera la soglia di positività per CD86. Per ogni batteria di prove si calcola

il valore EC150 (concentrazione alla quale la sostanza chimica raggiunge la soglia di positività di 150 % per CD86 - cfr. il paragrafo 19) se per CD86 si osserva una risposta positiva correlata alla concentrazione. Se la sostanza chimica in esame induce una risposta positiva per CD86 non correlata alla concentrazione, il calcolo del valore EC150 potrebbe non essere pertinente, come descritto nel protocollo U-SENS™ n. 183 del DB-ALM (12). Per ogni batteria di prove si calcola il valore CV70 (concentrazione alla quale la sostanza chimica raggiunge la soglia di citotossicità di 70 % - cfr. il paragrafo 19) ogniqualvolta possibile. Per valutare l'effetto della risposta correlata alla concentrazione dell'aumento di CD86, tutte le concentrazioni scelte tra quelle utilizzabili devono essere uniformemente ripartite tra EC150 (o la massima concentrazione non citotossica negativa per CD86) e CV70 (o la massima concentrazione consentita, vale a dire 200 µg/ml). Devono essere testate almeno 4 concentrazioni per batteria di prove, di cui almeno 2 comuni alla o alle batterie di prove precedenti, a fini di raffronto.

15. Il controllo con solvente/disperdente utilizzato nel metodo U-SENS™ è il mezzo completo (per le sostanze chimiche in esame solubilizzate o disperse stabilmente nel mezzo completo) (cfr. il paragrafo 4) o DMSO a 0,4 % nel mezzo completo (per le sostanze chimiche in esame solubilizzate o disperse stabilmente in DMSO).

16. Il controllo positivo utilizzato nel metodo U-SENS™ è il TNBS (cfr. il paragrafo 11), preparato in mezzo completo. Il TNBS deve essere utilizzato come controllo positivo per la misurazione dell'espressione di CD86 a una concentrazione finale unica nella piastra (50 µg/ml) che produce una vitalità cellulare > 70 %. Per ottenere una concentrazione di 50 µg/ml di TNBS nella piastra si prepara una soluzione madre di TNBS a 1 M (cioè 293 mg/ml) in mezzo completo e la si diluisce ulteriormente di un fattore 2 930 nel mezzo completo fino ad ottenere una soluzione di lavoro di 100 µg/ml. L'acido lattico (LA, CAS 50-21-5) è utilizzato come controllo negativo a 200 µg/ml, solubilizzato in mezzo completo (a partire da una soluzione madre di 0,4 mg/ml). Per ogni piastra di ciascuna batteria di prove si preparano tre repliche di controllo con mezzo completo non trattato, controllo con solvente/disperdente, controlli negativo e positivo (12). Altri controlli positivi adeguati possono essere utilizzati in caso di disponibilità di dati storici da cui ricavare criteri di accettabilità comparabili per la batteria di prove. I criteri di accettabilità della batteria di prove sono identici a quelli descritti per la sostanza chimica in esame (cfr. il paragrafo 12).

Applicazione delle sostanze chimiche in esame e delle sostanze di controllo

17. Il controllo con solvente/disperdente o le soluzioni di lavoro descritte ai paragrafi 14-16 sono mescolati nella proporzione 1:1 (v/v) con le sospensioni cellulari preparate nella piastra a fondo piatto a 96 pozzetti (cfr. il paragrafo 12). Le piastre trattate sono quindi messe in incubazione per 45 ± 3 ore a una temperatura di 37 °C con 5 % di CO_2. Prima dell'incubazione le piastre sono sigillate con una membrana semipermeabile al fine di evitare l'evaporazione di sostanze chimiche volatili e la contaminazione incrociata tra le cellule trattate con le sostanze chimiche in esame (12).

Colorazione cellulare

18. Dopo 45 ± 3 ore di esposizione le cellule sono trasferite in una piastra per microtitolazione con fondo a V e raccolte mediante centrifugazione. L'interferenza di solubilità è definita dalla presenza di cristalli o gocce visibili al microscopio 45 ± 3 ore dopo il trattamento (prima della colorazione cellulare). I supernatanti vengono scartati e le cellule rimanenti sono lavate una volta con 100 µl di tampone fosfato salino (PBS) ghiacciato contenente 5 % di siero fetale di vitello (tampone di colorazione). Dopo la centrifugazione le cellule sono rimesse in sospensione in 100 µl di tampone di colorazione e colorate con 5 µl (cioè 0,25 µg) di anticorpi anti-CD86 o anticorpi murini IgG1 (isotipo) marcati con FITC a 4°C per 30 minuti al riparo dalla luce. Devono essere utilizzati gli anticorpi descritti nel protocollo U-SENS™ n. 183 del DB-ALM (12) (per CD86: BD-PharMingen #5556 57 Clone: Fun-1, o Caltag/Invitrogen # MHCD8601 Clone: BU63; e per IgG1: BD-PharMingen #5557 48, o Caltag/Invitrogen # GM4992). Sulla base dell'esperienza degli sviluppatori del metodo di prova, l'intensità di fluorescenza dei vari lotti di anticorpi è generalmente costante. Per la prova possono essere usati altri cloni o fornitori di anticorpi che abbiano superato il controllo di reattività (cfr. il paragrafo 11). Tuttavia gli utilizzatori possono decidere di effettuare la titolazione degli anticorpi nelle loro condizioni di laboratorio per definire la concentrazione più adatta all'uso. È possibile avvalersi di

altri sistemi di rilevazione, quali anticorpi marcati con fluorocromo anti-CD86, purché si possa dimostrare che essi producono risultati simili agli anticorpi coniugati con FITC, ad esempio testando le sostanze di riferimento di cui all'appendice 2.2. Dopo due lavaggi con 100 µl di tampone di colorazione e un lavaggio con 100 µl di PBS ghiacciato, le cellule sono rimesse in sospensione in PBS ghiacciato (ad es. 125 µl per i campioni analizzati manualmente provetta per provetta o 50 µl se si utilizza un autocampionatore) ed è aggiunta una soluzione di PI (concentrazione finale di 3 µg/ml). È possibile utilizzare altri marcatori di citotossicità, tra cui la 7-aminoactinomicina D (7-AAD) e il blu di tripano, purché si dimostri che tali coloranti alternativi producono risultati simili al PI, ad esempio testando le sostanze di riferimento di cui all'appendice 2.2.

Analisi mediante citometria a flusso

19. Il livello di espressione di CD86 e la vitalità cellulare sono analizzati mediante citometria a flusso. Le cellule sono rappresentate su un grafico a punti in scala logaritmica in base alla taglia (FSC) e alla granularità (SSC) per identificare chiaramente la popolazione in un primo gate R1 ed eliminare i residui. L'obiettivo è acquisire un totale di 10 000 cellule nel gate R1 per ogni pozzetto. Le cellule appartenenti allo stesso gate R1 sono rappresentate su un grafico a punti FL3 o FL4/SSC. Le cellule vitali sono identificate tracciando un secondo gate R2 di selezione della popolazione cellulare negativa per lo ioduro di propidio (canale FL3 o FL4). La vitalità cellulare può essere calcolata dal programma di analisi del citometro mediante l'equazione riportata di seguito. Se la vitalità cellulare è bassa possono essere raccolte fino a 20 000 cellule, comprese le cellule morte. Un'opzione alternativa consiste nell'acquisire i dati per un minuto dall'inizio dell'analisi.

$$Vitalità\ cellulare = \frac{Numero\ di\ cellule\ vive}{Numero\ totale\ di\ cellule\ analizzate} \times 100$$

Si misura quindi la percentuale di cellule FL1-positive tra le cellule vitali comprese nel gate R2 (all'interno di R1). L'espressione di CD86 sulla superficie cellulare è analizzata mediante un grafico a punti FL1/SSC limitato alle cellule vitali (R2).

Per i pozzetti contenenti mezzo completo/IgG1 il marcatore di analisi è fissato in prossimità della popolazione principale in modo che i controlli con mezzo completo presentino un valore IgG1 compreso tra 0,6 e 0,9 %.

L'interferenza di colore è definita come scostamento della dispersione corrispondente agli IgG1 marcati con FITC (media geometrica di S.I. IgG1 FL1 ≥ 150 %).

L'indice di stimolazione (S.I.) di CD86 per le cellule di controllo (non trattate o in DMSO a 0,4 %) e per le cellule trattate con la sostanza chimica è calcolato mediante la seguente equazione:.

$$S.I. = \frac{\%\ di\ cellule\ trattate\ con\ CD86^{+} - \%\ di\ cellule\ di\ controllo\ IgG1^{+}}{\%\ di\ cellule\ di\ controllo\ CD86^{+} - \%\ di\ cellule\ di\ controllo\ IgG1^{+}lls} \times 100$$

% di cellule di controllo non trattate $IgG1^{+}$: percentuale di cellule IgG1 FL1-positive che superano il marcatore di analisi (intervallo di accettabilità ≥ 0,6 % e < 1,5 %, cfr. il paragrafo 22) tra le cellule vitali non trattate.

% di cellule di controllo $IgG1^{+}$/cellule trattate $CD86^{+}$: percentuale di cellule IgG1/CD86 FL1-positive misurata senza spostare il marcatore di analisi, tra le cellule vitali di controllo/cellule trattate.

Dati E Relazioni

Valutazione dei dati

20. I seguenti parametri sono calcolati con il metodo U-SENS™: il valore CV70, vale a dire la concentrazione che produce il 70 % di sopravvivenza di cellule U937 (30 % di citotossicità), e il valore EC150, vale a dire la concentrazione alla quale le sostanze chimiche in esame producono un indice di stimolazione (S.I.) di CD86 di 150 %.

Il valore CV70 è calcolato per interpolazione log-lineare mediante la seguente equazione:

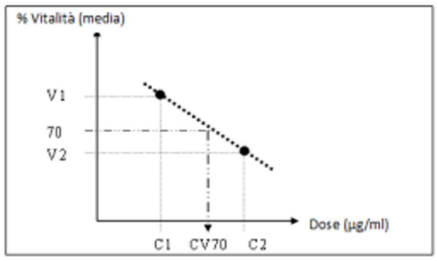
CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 – V2) * (C2 – C1)]

in cui:

V1 è il valore minimo di vitalità cellulare superiore a 70 %

V2 il valore massimo di vitalità cellulare inferiore a 70 %

C1 e C2 sono le concentrazioni che producono rispettivamente i valori di vitalità cellulare V1 e V2.



È possibile utilizzare altri metodi per calcolare il valore CV70, purché sia provato che ciò non incide sui risultati (ad es. testando le sostanze di riferimento).

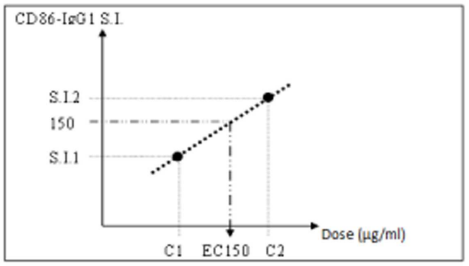
Il valore EC150 è calcolato per interpolazione log-lineare mediante la seguente equazione:

EC150 = C1 + [(150 – S.I.1) / (S.I.2 – S.I.1) * (C2 – C1)]

in cui:

C1 è la concentrazione più elevata in µg/ml con S.I. CD86 < 150 % (S.I. 1)

C2 è la concentrazione più bassa in µg/ml con S.I. CD86 ≥ 150 % (S.I. 2)



I valori EC150 e CV70 sono calcolati

— per ogni batteria di prove: i valori individuali EC150 e CV70 sono utilizzati per valutare l'effetto della risposta correlata alla concentrazione dell'aumento di CD86 (cfr. il paragrafo 14),

— il valore CV70 globale è determinato in funzione della vitalità media (12),

— il valore EC150 globale di una sostanza chimica in esame la cui predizione è risultata POSITIVA con il metodo U-SENS™ è determinato in funzione dei valori medi di S.I. di CD86 (cfr. il paragrafo 21) (12).

Modello predittivo

21. Per la misurazione dell'espressione di CD86 ciascuna sostanza chimica è testata in almeno quattro concentrazioni e in almeno due batterie di prove indipendenti (realizzate in giorni diversi) per ottenere una predizione unica (POSITIVA o NEGATIVA).

— La conclusione individuale di una batteria di prove U-SENS™ è considerata negativa (di seguito, N) se l'S.I. di CD86 è inferiore a 150 % a tutte le concentrazioni non citotossiche (vitalità cellulare ≥ 70 %) e se non è stata osservata alcuna interferenza (citotossicità, solubilità: cfr. il paragrafo 18 o colore: cfr. il paragrafo 19, a prescindere dalle concentrazioni non citotossiche a cui è osservata l'interferenza). In tutti gli altri casi: se l'S.I. di CD86 è superiore o uguale a 150 % e/o si osservano interferenze, la conclusione individuale di una batteria di prove U-SENS™ è considerata positiva (di seguito, P).

— Una predizione U-SENS™ è considerata NEGATIVA se almeno due batterie di prove indipendenti sono negative (N) (figura 1). Se le prime due batterie di prove sono negative (N), la predizione U-SENS™ è considerata NEGATIVA e non è necessario eseguire una terza batteria di prove.

— Una predizione U-SENS™ è considerata POSITIVA se almeno due batterie di prove indipendenti sono positive (P) (figura 1). Se le prime due batterie di prove sono positive (P), la predizione U-SENS™ è considerata POSITIVA e non è necessario eseguire una terza batteria di prove.

— Poiché non viene effettuata una prova di determinazione della dose, si ha un'eccezione se, nella prima batteria di prove, l'S.I. di CD86 è superiore o uguale a 150 % unicamente alla massima concentrazione citotossica. La batteria di prove è considerata NON CONCLUSIVA (NC) e si testano altre concentrazioni (tra la massima concentrazione non citotossica e la minima concentrazione citotossica - cfr. il paragrafo 20) in ulteriori batterie di prove. Se la batteria di prove risulta NC si svolgono almeno due batterie di prove supplementari; una quarta batteria di prove è svolta in caso di discordanza tra le batterie di prove 2 e 3 (N e/o P in qualunque combinazione) (figura 1). Le batterie di prove successive saranno considerate positive anche nel caso in cui soltanto una delle concentrazioni non citotossiche dia luogo a un valore di CD86 uguale o superiore a 150 %, dal momento che i parametri di concentrazione sono stati specificamente adattati alla sostanza chimica in esame. La predizione finale sarà basata sul risultato ottenuto nella maggioranza delle tre o quattro batterie di prove individuali (cioè 2 su 3 o 2 su 4) (figura 1).

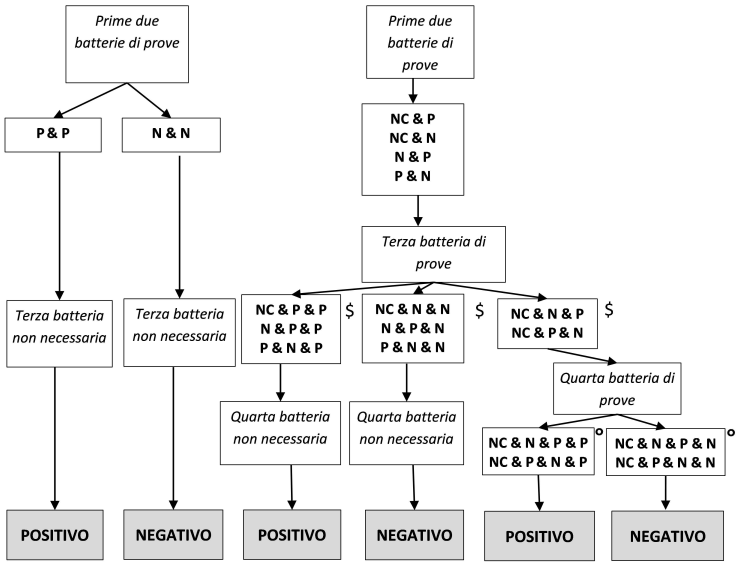


Figura 1: Modello predittivo utilizzato nel metodo U-SENS™. Una previsione U-SENS™ va considerata nell'ambito di un approccio IATA e in conformità alle disposizioni del paragrafo 4 e del paragrafi 7, 8 e 9 dell'Introduzione generale.

N: batteria di prove senza risultato positivo per CD86 né interferenza;

P: batteria di prove con risultato positivo per CD86 e/o interferenza/interferenze;

NC: non conclusiva. Prima batteria di prove non conclusiva se CD86 è positivo unicamente alla massima concentrazione non citotossica;

#: un risultato individuale non conclusivo (NC) attribuito unicamente alla prima batteria di prove comporta automaticamente la necessità di una terza batteria di prove per raggiungere una maggioranza di risultati positivi (P) o negativi (N) in almeno 2 batterie di prove indipendenti su 3.

$: i riquadri mostrano le combinazioni pertinenti di risultati delle prime tre batterie di prove sulla base dei risultati ottenuti nelle prime due batterie di prove (riportati nel riquadro che precede).

°: i riquadri mostrano le combinazioni pertinenti di risultati delle prime quattro batterie di prove sulla base dei risultati ottenuti nelle prime tre batterie di prove (riportati nel riquadro che precede).

Criteri di accettabilità

22. I seguenti criteri di accettabilità devono essere soddisfatti quando si utilizza il metodo di prova U-SENS™ (12).

— Al termine di un periodo di esposizione di 45 ± 3 ore la vitalità media delle tre repliche di cellule U937 non trattate deve essere > 90 % e non deve essere osservato alcuno scostamento dell'espressione di CD86. L'espressione basale di CD86 nelle cellule U937 non trattate deve essere compresa tra ≥ 2 % e ≤ 25 %.

— Se il solvente utilizzato è il DMSO, la sua validità come controllo con mezzo disperdente è valutata calcolando l'S.I. del DMSO rispetto a quello delle cellule non trattate, e la vitalità media delle tre repliche di cellule deve essere > 90 %. Il controllo con mezzo disperdente DMSO è valido se l'S.I. medio per CD86 nelle tre repliche è inferiore a 250 % dell'S.I. medio di CD86 nelle tre repliche di cellule U937 non trattate.

— Le batterie di prove sono considerate valide se almeno due dei tre valori IgG1 delle cellule U937 non trattate sono compresi tra ≥ 0,6 % e < 1,5 %.

— Il controllo negativo testato in parallelo (acido lattico) è considerato valido se almeno due delle tre repliche sono negative (S.I. CD86 < 150 %) e non citotossiche (vitalità cellulare ≥ 70 %).

— Il controllo positivo (TNBS) è considerato valido se almeno due delle tre repliche sono positive (S.I. CD86 ≥ 150 %) e non citotossiche (vitalità cellulare ≥ 70 %).

Relazione sulla prova

23. La relazione sulla prova comprende le informazioni riportate di seguito.

Sostanza chimica in esame

Sostanza monocostituente:

— identificazione della sostanza chimica: denominazioni quali i nomi IUPAC o CAS, i numeri CAS, il codice SMILES o InChI, la formula di struttura e/o altri identificatori;

— aspetto fisico, solubilità nel mezzo completo, solubilità nel DMSO, peso molecolare e proprietà fisico-chimiche pertinenti aggiuntive, a seconda dei dati disponibili;

— purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico, ecc.;

— trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione);

— concentrazione/i testata/e;

— condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;

— motivazione della scelta del solvente/disperdente per ciascuna sostanza chimica in esame.

Sostanza multicostituente, UVCB o miscela:

— caratterizzazione, nella misura del possibile, ad esempio attraverso l'identità chimica (cfr. sopra), la purezza, le proporzioni quantitative e le proprietà fisico-chimiche pertinenti (cfr. sopra) dei costituenti, secondo i dati disponibili;

— aspetto fisico, solubilità nel mezzo completo, solubilità nel DMSO e proprietà fisico-chimiche pertinenti aggiuntive, a seconda dei dati disponibili;

— peso molecolare o peso molecolare apparente nel caso di miscele/polimeri di composizione nota o altre informazioni pertinenti per la realizzazione dello studio;

— trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione);

— concentrazione/i testata/e;

— condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;

— motivazione della scelta del solvente/disperdente per ciascuna sostanza chimica in esame.

Controlli

Controllo positivo

— identificazione della sostanza chimica: denominazioni quali i nomi IUPAC o CAS, i numeri CAS, il codice SMILES o InChI, la formula di struttura e/o altri identificatori;

— aspetto fisico, solubilità nel DMSO, peso molecolare e proprietà fisico-chimiche pertinenti aggiuntive, se del caso e a seconda dei dati disponibili;

— purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico, ecc.;

— trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione);

— concentrazione/i testata/e;

— condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;

— riferimento ai dati storici relativi ai controlli positivi che dimostrano la conformità ai criteri di accettabilità, se del caso.

Controllo negativo e controllo con solvente/disperdente

— identificazione della sostanza chimica: denominazioni quali i nomi IUPAC o CAS, i numeri CAS, il codice SMILES o InChI, la formula di struttura e/o altri identificatori;

— purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico, ecc.;

— aspetto fisico, peso molecolare e altre proprietà fisico-chimiche pertinenti, nel caso siano utilizzati solventi/mezzi disperdenti diversi da quelli menzionati nelle linee guida e se disponibili;

— condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;

— motivazione della scelta del solvente/disperdente per ciascuna sostanza chimica in esame.

Condizioni di prova

— nome e indirizzo dello sponsor, dell'infrastruttura utilizzata per la prova e del responsabile dello studio;

— descrizione del sistema di prova utilizzato;

— linea cellulare utilizzata, condizioni di conservazione e provenienza (ad esempio, l'infrastruttura dalla quale provengono le cellule);

— tipo di citometria a flusso utilizzato (ad es. modello), comprese le impostazioni dello strumento, anticorpi e marcatore di citotossicità utilizzati;

— procedura utilizzata per dimostrare la competenza del laboratorio nell'esecuzione della prova mediante sostanze di riferimento o nel dimostrare la riproducibilità della prova nel tempo, ad esempio dati storici dei controlli e/o dei controlli di reattività.

Criteri di accettabilità della prova

— vitalità cellulare e valori S.I. CD86 ottenuti con il controllo con solvente/disperdente rispetto agli intervalli di accettabilità;

— vitalità cellulare e valori S.I. ottenuti con il controllo positivo rispetto agli intervalli di accettabilità;

— vitalità cellulare di tutte le concentrazioni testate della sostanza chimica in esame.

Procedura

— numero di prove realizzate;

— concentrazioni della sostanza chimica in esame, applicazione e tempo di esposizione (se diverso da quello raccomandato);

— durata dell'esposizione;

— descrizione dei criteri di valutazione e di decisione impiegati;

— descrizione di qualsiasi modifica della procedura sperimentale.

Risultati

— presentazione dei dati in formato tabulare, ivi compreso CV70 (se del caso), S.I., valori di vitalità cellulare, valori EC150 (se del caso) ottenuti per la sostanza chimica in esame e per il controllo positivo in ciascuna batteria di prove, e indicazione della classificazione della sostanza chimica in esame secondo il modello predittivo;

— descrizione di eventuali altre osservazioni pertinenti, se del caso.

Discussione dei risultati

— discussione dei risultati ottenuti con il metodo di prova U-SENS™;

— esame dei risultati della prova nel quadro di un approccio di tipo IATA, qualora siano disponibili altre informazioni pertinenti.

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

(1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

(2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Consultabile al seguente indirizzo: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations

(3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EN; doi 10.2 787/8157 37. Consultabile al seguente indirizzo: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].

(4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2 760/5889 55. Consultabile al seguente indirizzo: https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing.

(5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014.*Cosmetics* 3, 14.

(6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Consultabile al seguente indirizzo: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.

(8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.

(9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.

(10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1 683-1 696.

(11) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Consultabile al seguente indirizzo: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. Consultabile al seguente indirizzo: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

(13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.

(14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Consultabile al seguente indirizzo: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(15) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Consultabile al seguente indirizzo: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Consultabile al seguente indirizzo: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Consultabile al seguente indirizzo: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Appendice 2.1

DEFINIZIONI

Accuratezza: grado di concordanza tra i risultati ottenuti con la prova e i valori di riferimento comunemente accettati. Misura l'efficienza della prova e costituisce un aspetto della pertinenza. Il termine è spesso utilizzato come sinonimo di «concordanza», per indicare la proporzione di risultati corretti di una prova (14).

AOP (*Adverse Outcome Pathway*, meccanismo d'azione degli effetti avversi): sequenza di eventi che, a partire dalla struttura chimica di una sostanza chimica bersaglio o di un gruppo di sostanze chimiche simili, attraverso l'evento molecolare scatenante, produce un effetto avverso *in vivo* (15).

Risposta di CD86 indotta dalla concentrazione: si ha dipendenza dalla concentrazione (o risposta indotta dalla concentrazione) quando una concentrazione che induce una risposta positiva (I.S. CD86 ≥ 150) è seguita da una concentrazione con un I.S. CD86 crescente.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

CV70: concentrazione stimata che presenta una vitalità cellulare del 70 %.

Deriva: i) il valore corretto %$CD86^+$ della replica 3 del controllo non trattato è inferiore a 50 % della media corretta del valore %$CD86^+$ delle repliche 1 e 2 del controllo non trattato; e ii) il valore corretto %$CD86^+$ della replica 3 del controllo negativo è inferiore a 50 % della media corretta del valore %$CD86^+$ delle repliche 1 e 2 del controllo negativo.

EC150: concentrazioni stimate che producono un I.S. di 150 % di espressione di CD86.

Citometria a flusso: tecnica citometrica in cui le cellule sospese in un fluido passano velocemente e singolarmente attraverso un fascio luminoso di eccitazione, producendo schemi di diffusione della luce che sono caratteristici delle cellule e dei loro componenti; le cellule sono spesso marcate con marcatori fluorescenti di modo che la luce sia dapprima assorbita e quindi emessa a un'altra frequenza.

Pericolo: proprietà intrinseca di un agente o di una situazione che ha il potenziale di causare effetti nocivi se un organismo, un sistema o una (sotto-)popolazione vi sono esposti.

IATA (*Integrated Approaches to Testing and Assessment*, approcci integrati in materia di prove e valutazioni): approccio strutturato utilizzato per l'identificazione del pericolo (potenziale), la caratterizzazione del pericolo (potenza) e/o la valutazione della sicurezza (potenziale/potenza ed esposizione) di una sostanza chimica o di un gruppo di sostanze chimiche, che integra in modo strategico e ponderato tutti i dati pertinenti per orientare una decisione di tipo regolamentare concernente il pericolo potenziale e/o il rischio e/o la necessità di effettuare altre prove mirate e, pertanto, limitate allo stretto necessario.

Miscela: una miscela o una soluzione composta di due o più sostanze.

Sostanza monocostituente: sostanza, definita attraverso la sua composizione quantitativa, in cui un costituente principale è presente in percentuale pari ad almeno 80 % (p/p).

Sostanza multicostituente: sostanza, definita attraverso la sua composizione quantitativa, in cui più costituenti principali sono presenti in concentrazione ≥ 10 % (p/p) e < 80 % (p/p). Una sostanza multicostituente è il risultato di un processo di fabbricazione. La differenza tra miscela e sostanza multicostituente è che una miscela è ottenuta attraverso la miscelazione di due o più sostanze senza che avvenga una reazione chimica. Una sostanza multicostituente è il risultato di una reazione chimica.

Controllo positivo: replica contenente tutti i componenti di un sistema di prova, trattata con una sostanza che notoriamente induce una risposta positiva. Perché sia possibile valutare la variabilità nel tempo della risposta del controllo positivo, l'intensità di tale risposta non dovrebbe essere eccessiva.

Preapteni: sostanze chimiche che diventano sensibilizzanti tramite trasformazione abiotica, ad es. l'ossidazione.

Proapteni: sostanze chimiche che necessitano di una bioattivazione enzimatica per dispiegare il loro potenziale di sensibilizzazione cutanea.

Pertinenza: descrizione del rapporto tra la prova e l'effetto ricercato; indica se la prova è significativa e utile per uno scopo specifico. È il grado con cui la prova misura o prevede correttamente l'effetto biologico di interesse. La pertinenza comprende una valutazione dell'accuratezza (concordanza) di una prova (14).

Affidabilità: misura in cui una prova può essere riprodotta nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi utilizzando il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità interna ai laboratori e la ripetibilità fra i laboratori (14).

Batteria di prove: una batteria di prove consiste nel testare una o più sostanze chimiche in esame simultaneamente a un controllo con solvente/disperdente e a un controllo positivo.

Sensibilità: proporzione di tutte le sostanze chimiche positive/attive correttamente classificate dalla prova. Misura l'accuratezza di una prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di una prova (14).

S.I.: indice di stimolazione. Valore relativo della media geometrica dell'intensità di fluorescenza (MFI) delle cellule esposte alla sostanza chimica in esame confrontato con l'MFI di cellule trattate con solvente/disperdente.

Controllo con solvente/disperdente: campione non trattato contenente tutti i componenti di un sistema di prova, esclusa la sostanza chimica in esame, ma incluso il solvente/disperdente utilizzato. È utilizzato per stabilire la risposta di base per i campioni trattati con la sostanza chimica in esame disciolta o in dispersione stabile nello stesso solvente/disperdente. Se testato in concomitanza con un controllo con mezzo, questo campione dimostra anche se il solvente/disperdente interagisce con il sistema di prova.

Specificità: proporzione di tutte le sostanze chimiche negative/inattive correttamente classificate dalla prova. Misura l'accuratezza di una prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di una prova (14).

Tampone di colorazione: tampone fosfato salino contenente 5 % di siero fetale di vitello.

Sostanza: un elemento chimico e i suoi composti, allo stato naturale od ottenuti per mezzo di un procedimento di produzione, compresi gli additivi necessari a mantenerne la stabilità e le impurità derivanti dal procedimento utilizzato, ma esclusi i solventi che possono essere separati senza compromettere la stabilità della sostanza o modificarne la composizione.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata applicando il presente metodo di prova.

Sistema globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (UN GHS): sistema di classificazione delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) secondo tipi e livelli standardizzati di rischio fisico, sanitario e ambientale, che elabora i relativi elementi di comunicazione, quali pittogrammi, avvertenze, indicazioni di pericolo, consigli di prudenza e schede informative di sicurezza, per trasmettere informazioni sugli effetti avversi di dette sostanze a tutela delle persone (compresi datori di lavoro, lavoratori, trasportatori, consumatori e personale di pronto intervento) e dell'ambiente (16).

UVCB: sostanze la cui composizione non è conosciuta o è variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali origine biologica.

Metodo di prova valido: metodo di prova la cui pertinenza e affidabilità sono ritenute soddisfacenti per uno scopo specifico e che si fonda su principi scientificamente provati. Un metodo di prova non è mai valido in assoluto ma solo in relazione a un determinato scopo (14).

Appendice 2.2

SOSTANZE CHIMICHE PER LA VERIFICA DELLA COMPETENZA TECNICA

Prima di utilizzare come test di routine la prova descritta nella presente appendice per il metodo di prova B.71, i laboratori sono tenuti a dimostrare la loro competenza tecnica ottenendo correttamente la predizione attesa con il metodo U-SENS™ per le 10 sostanze raccomandate nella tabella 1 e ottenendo valori CV70 e EC150 che rientrino nel rispettivo intervallo di riferimento per almeno 8 delle 10 sostanze di riferimento. Tali sostanze sono state selezionate per rappresentare la gamma di risposte per quanto riguarda i pericoli di sensibilizzazione cutanea. Altri criteri di selezione riguardavano la disponibilità in commercio delle sostanze e la disponibilità di dati di riferimento *in vivo* e di dati *in vitro* di elevata qualità ottenuti con il metodo U-SENS™. Sono inoltre disponibili dati di riferimento pubblicati per il metodo U-SENS™ (1) (8).

Tabella 1

Sostanze raccomandate per la verifica della competenza tecnica con il metodo di prova U-SENS™

Sostanze di prova per la verifica della competenza	N. CAS	Stato fisico	Predizione *in vivo* [1]	U-SENS Solvente/disperdente	U-SENS Intervallo di riferimento CV70 in µg/ml [2]	U-SENS Intervallo di riferimento EC150 in µg/ml) [2]
4-Fenilendiammina	106-50-3	Solido	Sensibilizzante (elevato)	Mezzo completo [3]	<30	Positivo (≤10)
Acido picrilsulfonico	2508-19-2	Liquido	Sensibilizzante (elevato)	Mezzo completo	>50	Positivo (≤50)
Maleato di dietile	141-05-9	Liquido	Sensibilizzante (moderato)	DMSO	10-100	Positivo (≤20)
Resorcinolo	108-46-3	Solido	Sensibilizzante (moderato)	Mezzo completo	>100	Positivo (≤50)
Alcol cinnamico	104-54-1	Solido	Sensibilizzante (debole)	DMSO	>100	Positivo (10-100)
4-Allilanisolo	140-67-0	Liquido	Sensibilizzante (debole)	DMSO	>100	Positivo (<200)
Saccarina	81-07-2	Solido	Non sensibilizzante	DMSO	>200	Negativo (>200)
Glicerolo	56-81-5	Liquido	Non sensibilizzante	Mezzo completo	>200	Negativo (>200)
Acido lattico	50-21-5	Liquido	Non sensibilizzante	Mezzo completo	>200	Negativo (>200)
Acido salicilico	69-72-7	Solido	Non sensibilizzante	DMSO	>200	Negativo (>200)

Abbreviazioni: N.CAS (*Chemical Abstracts Service Registry Number*) = Numero CAS (numero di registrazione nell'inventario europeo delle sostanze chimiche).

[1] La predizione *in vivo* del pericolo (e della potenza) è basata su dati LLNA (1) (8). La potenza *in vivo* è determinata mediante criteri proposti da ECETOC (17).

[2] Sulla base dei dati storici osservati (1) (8).

[3] Mezzo completo: mezzo di coltura RPMI-1640 integrato da 10 % di siero fetale di vitello, 2 mM di L-glutammina, 100 unità/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomicina (8).

Appendice 3

SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA *IN VITRO*: METODO DI PROVA IL-8 LUC

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

1. Contrariamente ai metodi di prova che analizzano l'espressione di marcatori di superficie cellulare, il metodo di prova IL8-Luc quantifica le variazioni dell'espressione di IL-8, una citotossina associata all'attivazione di cellule dendritiche (DC). Nella linea cellulare reporter IL-8 derivata dalla linea cellulare THP-1 (THP-G8, stabilita dalla linea cellulare di leucemia monocitica acuta umana THP-1), l'espressione di IL-8 è misurata in seguito all'esposizione a sensibilizzanti (1). Il livello di espressione della luciferasi è quindi utilizzato per contribuire a distinguere tra sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanei.

2. Il metodo di prova IL-8 Luc è stato oggetto di uno studio di validazione (2) condotto dal Centro giapponese di validazione di metodi alternativi (JaCVAM), dal **ministero dell'Economia, del commercio e dell'industria** (METI) e dalla Società giapponese **per i metodi alternativi alla sperimentazione animale (JSAAE**), cui ha fatto seguito una revisione indipendente *inter pares* (3) sotto la guida del JaCVAM e del ministero della Salute, del lavoro e della sicurezza sociale (MHLW) con il sostegno della **Cooperazione internazionale relativa ai metodi alternativi alla sperimentazione animale** (ICATM). Tenuto conto di tutti i dati disponibili e dei pareri formulati dalle autorità di regolamentazione e dai portatori di interessi, si ritiene che il metodo di prova IL-8 Luc possa efficacemente contribuire, nell'ambito di una metodologia integrata di tipo IATA, a distinguere tra sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanei a fini di classificazione ed etichettatura del pericolo. In letteratura figurano esempi dell'uso dei dati del metodo di prova IL-8 Luc in combinazione con altre informazioni (4) (5) (6).

3. È stato dimostrato che il metodo di prova IL-8 Luc può essere applicato in laboratori con esperienza di coltura cellulare e misurazione della luciferasi. Il livello di riproducibilità era dell'ordine dell'87,7 % all'interno dello stesso laboratorio e dell'87,5 % fra laboratori diversi (2). I dati ottenuti nello studio di valutazione (2) e in altri studi pubblicati (1) (6) indicano che, rispetto all'LLNA, il metodo di prova IL-8 Luc ha permesso di ottenere una predizione positiva o negativa per 118 sostanze chimiche su 143 e ha fornito risultati non conclusivi per 25 sostanze; l'accuratezza del metodo IL-8 Luc nella distinzione tra sensibilizzanti (categoria 1 del GHS dell'ONU/CLP) e non sensibilizzanti cutanei («senza categoria» del GHS dell'ONU/CLP) è dell'86 % (101/118), con una sensibilità del 96 % (92/96) e una specificità del 41 % (9/22). Se non si tiene conto delle sostanze chimiche che esulano dall'ambito di applicabilità descritto di seguito (paragrafo 5), il metodo di prova IL-8 Luc ha permesso di classificare 113 sostanze chimiche su 136 come positive o negative e 23 sostanze come non conclusive; l'accuratezza del metodo IL-8 Luc è dell'ordine dell'89 % (101/113), con una sensibilità del 96 % (92/96) e una specificità del 53 % (9/17). Se ci si avvale dei dati relativi all'uomo citati in Urbisch *et al.* (7), il metodo di prova IL-8 Luc ha permesso di classificare 76 sostanze chimiche su 90 come positive o negative e 14 sostanze come non conclusive; l'accuratezza dell'IL-8 Luc è dell'ordine dell'80 % (61/76), con una sensibilità del 93 % (54/58) e una specificità del 39 % (7/18). Se non si tiene conto delle sostanze chimiche che esulano dall'ambito di applicabilità, il metodo di prova IL-8 Luc ha permesso di classificare 71 sostanze chimiche su 84 come positive o negative e 13 sostanze come non conclusive; l'accuratezza dell'IL-8 Luc è dell'ordine dell'86 % (61/71), con una sensibilità del 93 % (54/58) e una specificità del 54 % (7/13). È probabile che i falsi negativi nelle predizioni formulate con il metodo di prova IL-8 Luc riguardino piuttosto le sostanze chimiche con una potenza di sensibilizzazione cutanea da bassa a moderata (sottocategoria 1B del GHS dell'ONU/CLP) rispetto alle sostanze chimiche con una potenza elevata (sottocategoria 1A del GHS dell'ONU/CLP) (6). L'insieme di queste informazioni indica che l'IL-8 Luc può efficacemente contribuire all'identificazione del pericolo di sensibilizzazione cutanea. I valori di accuratezza forniti per il metodo di prova IL-8 Luc utilizzato isolatamente sono puramente indicativi, in quanto la prova dovrebbe essere considerata in combinazione con altre fonti di informazione nell'ambito di un approccio IATA e in conformità alle disposizioni dei paragrafi 7 e 8 dell'Introduzione generale. Inoltre, nel valutare le prove di sensibilizzazione cutanea che non utilizzano la sperimentazione animale si deve tenere presente che l'LLNA, come pure altre prove che utilizzano la sperimentazione animale, può non riflettere pienamente la situazione per l'uomo.

4. I dati attualmente disponibili indicano che il metodo di prova IL-8 Luc è applicabile alle sostanze chimiche in esame relative a diversi gruppi funzionali organici, meccanismi di reazione, potenze di sensibilizzazione cutanea (determinate negli studi *in vivo*) e proprietà fisico-chimiche (2)(6).

5. Nonostante utilizzi il solvente X-VIVO™ 15, il metodo di prova IL-8 Luc ha permesso di valutare correttamente sostanze chimiche con un Log K_{ow} > 3,5 e sostanze con un grado di idrosolubilità di circa 100 µg/ml calcolato con il programma EPI Suite™ e la sua efficienza nell'individuare sensibilizzanti scarsamente idrosolubili è superiore a quella del metodo di prova IL-8 Luc realizzato con il solvente dimetilsulfossido (DMSO) (2). Tuttavia, i risultati negativi ottenuti con sostanze chimiche in esame che non vengono disciolte a 20 mg/ml possono dar luogo a falsi negativi, in quanto le sostanze non sono solubili in X-VIVO™ 15. Per tali sostanze chimiche, quindi, non si devono prendere in considerazione risultati negativi. Nell'ambito dello studio di validazione si è osservato un tasso elevato di falsi negativi per le anidridi. Inoltre, a causa della capacità metabolica limitata della linea cellulare utilizzata (8) e delle condizioni sperimentali, i proapteni (sostanze che richiedono un'attivazione enzimatica) e i preapteni (sostanze attivate mediante ossidazione) possono dare risultati negativi nella prova. Tuttavia, anche se i risultati negativi ottenuti con potenziali pre/proapteni devono essere interpretati con cautela, va osservato che il metodo di prova IL-8 Luc ha permesso di identificare correttamente 11 preapteni su 11, 6 proapteni su 6 e 6 pre/proapteni su 8 nella serie di dati dell'IL-8 Luc (2). L'esame globale recentemente effettuato su tre metodi di prova che non comportano l'impiego di animali (DPRA, KeratinoSens™ e h-CLAT) per l'individuazione di preapteni e proapteni (9) e il fatto che le cellule THP-G8 utilizzate nel metodo di prova IL-8 Luc sono una linea cellulare derivata dalla linea THP-1 che è utilizzata nell'h-CLAT, consentono di concludere che l'IL-8 Luc, in combinazione con altri metodi, può inoltre contribuire a migliorare la sensibilità delle prove senza l'impiego di animali nell'individuazione di pre- e proapteni. I tensioattivi testati fino ad oggi hanno dato risultati (falsi) positivi a prescindere dal tipo (cationici, anionici o non-ionici). Infine, le sostanze chimiche che interferiscono con la luciferasi possono alterarne l'attività/misurazione, provocando un'inibizione apparente o una maggiore luminescenza (10). Ad esempio, è stato segnalato che concentrazioni di fitoestrogeni superiori a 1 µM interferirebbero con i segnali di luminescenza in altri metodi di prova con geni reporter basati sulla luciferasi a causa della sovrattivazione del gene reporter della luciferasi. Di conseguenza, è necessario esaminare attentamente l'espressione della luciferasi ottenuta in presenza di concentrazioni elevate di fitoestrogeni o di composti sospettati di indurre un'attivazione del gene reporter della luciferasi comparabile a quella causata dai fitoestrogeni (11). Sulla base di quanto precede, i tensioattivi, le anidridi e le sostanze chimiche che interferiscono con la luciferasi non rientrano nel campo di applicabilità del presente metodo di prova. Nel caso in cui si dimostri che il metodo di prova IL-8 Luc non è applicabile ad altre categorie specifiche di sostanze chimiche in esame, è opportuno evitare di utilizzare tale protocollo per tali categorie.

6. Come già precisato, il metodo di prova IL-8 Luc aiuta a distinguere tra sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanei. Sono necessarie ulteriori ricerche, di preferenza basate su dati relativi all'uomo, per determinare se i risultati del protocollo IL-8 Luc possano contribuire, insieme ad altre fonti di informazione, alla valutazione della potenza di sensibilizzazione.

7. Le definizioni figurano nell'appendice 3.1.

PRINCIPIO DELLA PROVA

8. Il metodo di prova IL-8 Luc si avvale di una linea cellulare di leucemia monocitica umana THP-1 proveniente dall'*American Type Culture Collection* (Manassas, VA, USA). A partire da questa linea cellulare il dipartimento di dermatologia della facoltà di medicina dell'università di Tohoku ha sviluppato la linea THP-G8, una linea cellulare reporter IL-8 derivata dalla THP-1 che contiene i geni della luciferasi arancione (*Stable Luciferase Orange*, SLO) e della luciferasi rossa (*Stable Luciferase Red*, SLR) sotto il controllo dei promotori dell'IL-8 e della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) rispettivamente (1). Questo sistema consente di quantificare l'induzione del gene della luciferasi rilevando la luminescenza emessa da substrati di luciferasi che producono una luminescenza soddisfacente come indicatore dell'attività di IL-8 e della GAPDH nelle cellule in seguito all'esposizione a sostanze sensibilizzanti.

9. Il sistema di prova bicromatico comprende una luciferasi che emette luce arancione (SLO; λmax = 580 nm) (12) per l'espressione genica del promotore IL-8 e una luciferasi che emette luce rossa (SLR; λmax = 630 nm) (13) per l'espressione genica del promotore del controllo interno, GAPDH. Le due luciferasi emettono colori diversi quando reagiscono con la d-luciferina di lucciola e la loro luminescenza è misurata simultaneamente in una reazione a fase singola dividendo la luce emessa dalla miscela di prova mediante un filtro ottico (14) (appendice 3.2).

10. Le cellule THP-G8 sono trattate per 16 ore con la sostanza chimica in esame, quindi si misura l'attività della luciferasi SLO (SLO-LA), indice dell'attività del promotore IL-8, e l'attività della luciferasi SLR (SLR-LA), indice dell'attività del promotore GAPDH. Per facilitare la comprensione delle abbreviazioni, SLO-LA e SLR-LA sono indicate rispettivamente come IL8LA e GAPLA. Nella tabella 1 figura una descrizione dei termini associati all'attività della luciferasi nel metodo di prova IL-8 Luc. I valori misurati sono utilizzati per calcolare l'IL8LA normalizzata (nIL8LA), che è il rapporto IL8LA/GAPLA, l'induzione di nIL8LA (Ind-IL8LA), che è il rapporto tra la media aritmetica dei quattro valori misurati di nIL8LA delle cellule THP-G8 trattate con una sostanza chimica in esame e i valori di nIL8LA delle cellule THP-G8 non trattate, e l'inibizione di GAPLA (Inh-GAPLA), che è il rapporto tra la media aritmetica dei quattro valori misurati di GAPLA delle cellule THP-G8 trattate con una sostanza chimica in esame e i valori di GAPLA delle cellule THP-G8 non trattate, e che è utilizzata come indicatore di citotossicità.

Tabella 1

Descrizione dei termini associati all'attività della luciferasi nel metodo di prova IL-8 Luc.

Abbreviazioni	Definizione
GAPLA	Attività della luciferasi SLR indicativa dell'attività del promotore GAPDH
IL8LA	Attività della luciferasi SLO indicativa dell'attività del promotore IL-8
nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA delle cellule THP-G8 trattate con le sostanze chimiche / nIL8LA delle cellule non trattate
Inh-GAPLA	GAPLA delle cellule THP-G8 trattate con le sostanze chimiche /GAPLA delle cellule non trattate
CV05	La concentrazione minima della sostanza chimica alla quale Inh-GAPLA è < 0,05.

11. Sono disponibili standard di prestazione (15) che facilitano la validazione di metodi di prova della luciferasi IL-8 *in vitro* modificati simili al metodo di prova IL-8 Luc e permettono di modificare rapidamente la linea guida dell'OCSE 442E per poterveli inserire. L'accettazione reciproca dei dati nel quadro dell'OCSE sarà garantita solo per i metodi di prova validati in base agli standard di prestazione, se tali metodi di prova sono stati esaminati e integrati dall'OCSE nella linea guida 442E.

DIMOSTRAZIONE DELLA COMPETENZA

12. Prima di utilizzare come test di routine la prova descritta nella presente appendice relativa al metodo di prova B.71, i laboratori devono dimostrare le loro competenze tecniche utilizzando le 10 sostanze di riferimento elencate nell'appendice 3.3, conformemente alle buone pratiche per i metodi *in vitro* (17). Inoltre gli utilizzatori del metodo devono mantenere una banca dati storica contenente i dati ottenuti con i controlli di reattività (cfr. il paragrafo 15) nonché con i controlli positivi e con solvente/disperdente (cfr. i paragrafi 21-24) e utilizzare tali dati per confermare la persistenza nel tempo della riproducibilità della prova nel loro laboratorio.

PROCEDURA

13. La procedura operativa standard per il metodo di prova IL-8 Luc è disponibile e dovrebbe essere applicata quando si utilizza questo metodo di prova (18). I laboratori che intendono applicare questo metodo di prova possono ottenere la linea cellulare ricombinante THP-G8 dal laboratorio GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Giappone, previa sottoscrizione di

un accordo di trasferimento di materiale (*Material Transfer Agreement*, MTA) secondo le condizioni riportate nel modello dell'OCSE. Nei paragrafi che seguono è fornita una descrizione dei principali elementi e procedure del metodo di prova.

Preparazione delle cellule

14. Per l'esecuzione del metodo di prova IL-8 Luc è opportuno utilizzare la linea cellulare THP-G8 del laboratorio GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Giappone, (cfr. i paragrafi 8 e 13). Al ricevimento, le cellule sono moltiplicate (2-4 passaggi) al fine di costituire uno stock omogeneo da conservare in stato di congelamento. Le cellule di questo stock possono essere moltiplicate fino a un massimo di 12 passaggi o per un massimo di 6 settimane. Il mezzo di coltura utilizzato per la propagazione cellulare è l'RPMI-1640 contenente 10 % di siero fetale bovino (FBS), una soluzione antibiotica/antimicotica (100 U/ml di penicillina G, 100 µg/ml di streptomicina e 0,25 µg/ml di amfotericina B in una soluzione salina allo 0,85 %) (ad es. GIBCO Cat#15240-062), 0,15 µg/ml di puromicina (ad es. CAS:58-58-2) e 300 µg/ml di G418 (ad es. CAS:108321-42-2).

15. Prima di essere utilizzate per la prova, le cellule devono essere qualificate mediante un controllo di reattività da realizzarsi dopo 1-2 settimane o 2-4 passaggi dallo scongelamento mediante 4-nitrobenzilbromuro (4-NBB) (CAS:100-11-8, purezza ≥ 99 %) come controllo positivo e acido lattico (LA) (CAS:50-21-5, purezza ≥ 85 %) come controllo negativo. Il 4-NBB deve dar luogo a una risposta positiva per Ind-IL8LA (≥ 1,4) e l'acido lattico deve dar luogo a una risposta negativa per Ind-IL8LA (< 1,4). Per la prova vengono utilizzate unicamente le cellule che superano il controllo di reattività. Il controllo va effettuato secondo le procedure descritte ai paragrafi 22-24.

16. Per la prova, le cellule THP-G8 sono inoculate a una densità compresa tra 2 e 5 × 10^5 cellule/ml e precoltivate in fiasche di coltura per una durata compresa tra 48 e 96 ore. Il giorno della prova le cellule raccolte dalla fiasca di coltura sono lavate con RPMI-1640 contenente 10 % di FBS senza antibiotici, poi sono rimesse in sospensione a una densità di 1 × 10^6 cellule/ml con RPMI-1640 contenente 10 % di FBS senza antibiotici. Quindi le cellule sono ripartite su una piastra nera a fondo piatto a 96 pozzetti (ad es. Costar Cat#3603) con 50 µl (5 × 10^4 cellule/pozzetto).

Preparazione della sostanza chimica in esame e delle sostanze di controllo

17. La sostanza chimica in esame e le sostanze di controllo vengono preparate il giorno della prova. Per il metodo di prova IL-8 Luc, le sostanze chimiche in esame vengono disciolte in X-VIVO™ 15, un mezzo senza siero disponibile in commercio (Lonza, 04-418Q), fino a una concentrazione finale di 20 mg/ml. Il mezzo X-VIVO™ 15 è addizionato a 20 mg di sostanza chimica in esame (a prescindere dalla solubilità della sostanza chimica) in una provetta da microcentrifuga fino a raggiungere un volume di 1 ml e successivamente agitato vigorosamente su vortex e posto su un rotore a una velocità massima di 8 rpm per 30 minuti a una temperatura ambiente di circa 20°C. Inoltre, se le sostanze chimiche solide continuano a essere insolubili, la provetta è sonicata fino a dissoluzione completa della sostanza o fino all'ottenimento di una dispersione stabile. Se le sostanze chimiche in esame sono solubili in X-VIVO™ 15, la soluzione è diluita di un fattore 5 con X-VIVO™ 15 e utilizzata come soluzione madre della sostanza chimica in X-VIVO™ 15 (4 mg/ml). Se le sostanze chimiche in esame non sono solubili in X-VIVO™ 15, la miscela è nuovamente agitata su rotore per almeno 30 minuti e successivamente centrifugata a 15000 rpm (≈ 20000 *g*) per 5 minuti; il supernatante così ottenuto è utilizzato come soluzione madre della sostanza chimica in esame in X-VIVO™ 15. Qualora si utilizzino altri solventi, quali DMSO, acqua o mezzo di coltura, è necessario fornire un'adeguata motivazione scientifica. L'appendice 3.5 illustra la procedura dettagliata per la diluizione delle sostanze chimiche. Le soluzioni in X-VIVO™ 15 descritte ai paragrafi 18-23 sono mescolate nella proporzione 1:1 (v/v) con le sospensioni cellulari preparate nella piastra nera a fondo piatto a 96 pozzetti (cfr. il paragrafo 16).

18. La prima batteria di prove è intesa a determinare la concentrazione citotossica e a valutare il potenziale di sensibilizzazione cutanea delle sostanze chimiche. Avvalendosi di X-VIVO™ 15, si effettuano diluizioni in serie di fattore 2 delle soluzioni madre delle sostanze chimiche in esame in X-VIVO™ 15 (cfr. l'appendice 3.5) mediante un blocco a 96 pozzetti (ad es. Costar Cat#EW-01729-03). Quindi 50 µl/pozzetto di soluzione diluita sono addizionati a 50 µl di sospensione cellulare in una piastra nera a fondo piatto da 96 pozzetti. Pertanto, per le sostanze chimiche in esame solubili in X-VIVO ™ 15, le concentrazioni finali della sostanza chimica vanno da 0,002 a 2 mg/ml (appendice 3.5). Per le sostanze chimiche in esame non solubili in X-VIVO ™ 15 a 20 mg/ml vengono determinati unicamente fattori di diluizione compresi tra 2 e 2^{10}, nonostante le concentrazioni finali effettive delle sostanze chimiche rimangano incerte e dipendano dalla concentrazione di saturazione delle sostanze stesse nella soluzione madre di X-VIVO™ 15.

19. Nelle batterie di prove successive (seconda, terza e quarta replica), la soluzione madre di X-VIVO™ 15 è preparata a una concentrazione 4 volte superiore alla concentrazione di vitalità cellulare 05 (CV05; la concentrazione minima alla quale Inh-GAPLA è < 0,05) osservata nel primo esperimento. Se il valore Inh-GAPLA non scende al di sotto di 0,05 alla concentrazione massima utilizzata nella prima prova, la soluzione madre X-VIVO™ 15 è preparata alla concentrazione massima della prima batteria di prove. La concentrazione CV05 è calcolata dividendo la concentrazione della soluzione madre della prima batteria di prove per il fattore di diluizione di CV05 (X) necessario per diluire la soluzione madre fino a raggiungere il valore CV05 (cfr. l'appendice 3.5). Per le sostanze chimiche in esame non solubili in X-VIVO a 20 mg/ml, il valore CV05 è determinato dalla concentrazione della soluzione madre × 1/X. Per le batterie di prove da 2 a 4 viene preparata una seconda soluzione madre a una concentrazione di 4 × CV05 (appendice 3.5).

20. Diluizioni in serie di fattore 1,5 delle seconde soluzioni madre di X-VIVO™ 15 vengono effettuate utilizzando un blocco a 96 pozzetti. Quindi 50 µl/pozzetto di soluzione diluita sono addizionati a 50 µl di sospensione cellulare nei pozzetti di una piastra nera a fondo piatto da 96 pozzetti. Ciascuna concentrazione della sostanza chimica in esame deve essere testata in 4 pozzetti. I campioni sono successivamente miscelati su un agitatore di piastre e messi in incubazione per 16 ore a 37 °C e 5 % CO_2, quindi si misura l'attività della luciferasi come descritto nel prosieguo.

21. Il controllo con solvente è la miscela di 50 µl/pozzetto di X-VIVO™ 15 e 50 µl/pozzetto di sospensione cellulare in RPMI-1640 contenente 10 % di FBS.

22. Il controllo positivo raccomandato è il 4-NBB. A 20 mg di 4-NBB preparati in una provetta da microcentrifuga da 1,5-ml si aggiunge X-VIVO™ 15 fino a raggiungere 1 ml. La provetta è agitata vigorosamente su vortex e posta su un rotore a una velocità massima di 8 rpm per almeno 30 minuti. Dopo centrifugazione a 20000 g per 5 minuti, il supernatante è diluito di un fattore 4 con X-VIVO™ 15 e 500 µl del supernatante diluito sono trasferiti in un blocco a 96 pozzetti. Il supernatante diluito è ulteriormente diluito con X-VIVO™ 15 di un fattore 2 e 4 e 50 µl della soluzione sono addizionati a 50 µl di sospensione cellulare THP-G8 nei pozzetti di una piastra nera a fondo piatto a 96 pozzetti (appendice 3.6). Ciascuna concentrazione del controllo positivo deve essere testata in 4 pozzetti. La piastra è agitata su un agitatore e messa in incubazione in un incubatore a CO_2 per 16 ore (37 °C, 5 % CO_2), quindi si misura l'attività della luciferasi come descritto al paragrafo 29.

23. Il controllo negativo raccomandato è l'acido lattico. A 20 mg di acido lattico preparati in una provetta da microcentrifuga da 1,5-ml si aggiunge X-VIVO™ 15 fino a raggiungere 1 ml (20 mg/ ml). Si diluiscono 20 mg/ml di soluzione di acido lattico di un fattore 5 con X-VIVO™ 15 (4 mg/ml); 500 µl di questa soluzione di acido lattico a 4 mg/ml vengono poi trasferiti in un pozzetto di un blocco a 96 pozzetti. Questa soluzione viene diluita di un fattore 2 con X-VIVO™ 15, quindi nuovamente diluita di un fattore 2 per ottenere soluzioni a 2 mg/ml e 1 mg/ml. 50 µl di queste 3 soluzioni e del controllo con disperdente (X-VIVO™ 15) sono addizionati a 50 µl di sospensione cellulare THP-G8 nei pozzetti di una piastra nera a fondo piatto a 96 pozzetti. Ciascuna concentrazione del controllo negativo è testata in 4 pozzetti. La piastra è agitata su un agitatore e messa in incubazione in un incubatore a CO_2 per 16 ore (37 °C, 5 % CO_2), quindi si misura l'attività della luciferasi come descritto al paragrafo 29.

24. Altri controlli positivi o negativi adeguati possono essere utilizzati in caso di disponibilità di dati storici da cui ricavare criteri di accettabilità comparabili per la prova.

25. Si avrà cura di evitare l'evaporazione delle sostanze chimiche volatili in esame nonché la contaminazione incrociata tra i pozzetti da parte delle sostanze stesse, ad esempio sigillando la piastra prima dell'incubazione con le sostanze chimiche in esame.

26. Per le sostanze chimiche in esame e il controllo con solvente occorrono da 2 a 4 batterie di prove per ottenere una predizione negativa o positiva (cfr. la tabella 2). Ogni batteria di prove è eseguita in un giorno diverso con una nuova soluzione madre delle sostanze chimiche in esame in X-VIVO™ 15 e cellule raccolte in modo indipendente. Le cellule possono provenire dallo stesso passaggio.

Misurazioni dell'attività della luciferasi

27. La luminescenza è misurata con un luminometro per micropiastre a 96 pozzetti dotato di filtri ottici, ad es. delle serie Phelios (ATTO, Tokyo, Giappone), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Germania) o ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Il luminometro deve essere calibrato per ogni prova al fine di garantire la riproducibilità (19). Per la calibrazione esistono luciferasi ricombinanti a emissione arancione e rossa.

28. In ciascun pozzetto della piastra contenente la sospensione cellulare trattata con o senza sostanza chimica si trasferiscono 100 µl di reagente preriscaldato Tripluc® Luciferase (Tripluc). La piastra è agitata per 10 minuti a una temperatura ambiente di circa 20 °C e successivamente collocata nel luminometro per misurare l'attività della luciferasi. La bioluminescenza è misurata per 3 secondi senza filtro ottico (F0) e per altri 3 secondi con filtro ottico (F1). L'eventuale ricorso a impostazioni alternative, ad esempio per adeguarsi al modello di luminometro utilizzato, deve essere opportunamente giustificato.

29. Per ogni concentrazione i parametri sono calcolati a partire dai valori misurati, ad esempio IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, la media ± deviazione standard (SD) di IL8LA, la media ± SD di GAPLA, la media ± SD di nIL8LA, la media ± SD di Ind-IL8LA, la media ± SD di Inh-GAPLA e l'intervallo di confidenza del 95 % per Ind-IL8LA. Le definizioni dei parametri utilizzati nel presente paragrafo sono riportate rispettivamente nelle appendici 3.1 e 3.4.

30. Prima di procedere alla misurazione, nelle prove con reporter policromatici si effettua generalmente una discriminazione cromatica mediante rivelatori (luminometro e lettore di piastre) dotati di filtri ottici, quali filtri taglia banda (passa-alto o passa-basso) o filtri passa-banda. I coefficienti di trasmissione dei filtri per ciascun colore del segnale di bioluminescenza devono essere calibrati prima della prova, come descritto nell'appendice 3.2.

DATI E RELAZIONI

Valutazione dei dati

31. I criteri da rispettare in ogni batteria di prove per formulare una decisione positiva o negativa sono i seguenti:

— una predizione formulata con il metodo di prova IL-8 Luc è considerata positiva se una sostanza chimica in esame presenta un valore Ind-IL8LA ≥ 1,4 e il limite inferiore dell'intervallo di confidenza del 95 % di Ind-IL8LA ≥ 1,0

— una predizione formulata con il metodo di prova IL-8 Luc è considerata negativa se una sostanza chimica in esame presenta un valore Ind-IL8LA < 1,4 e il limite inferiore dell'intervallo di confidenza del 95 % di Ind-IL8LA < 1,0

Modello predittivo

32. Le sostanze chimiche in esame che producono due risultati positivi nella 1ª, 2ª, 3ª o 4ª batteria di prove sono considerate positive, quelle che producono tre risultati negativi nella 1ª, 2ª, 3ª o 4ª batteria di prove sono considerate presumibilmente negative (tabella 2). Tra le sostanze chimiche presumibilmente negative, le sostanze disciolte a 20 mg/ml di X-VIVO™ 15 sono considerate negative, mentre le sostanze non disciolte a 20 mg/ml di X-VIVO™ 15 non sono prese in considerazione (figura 1).

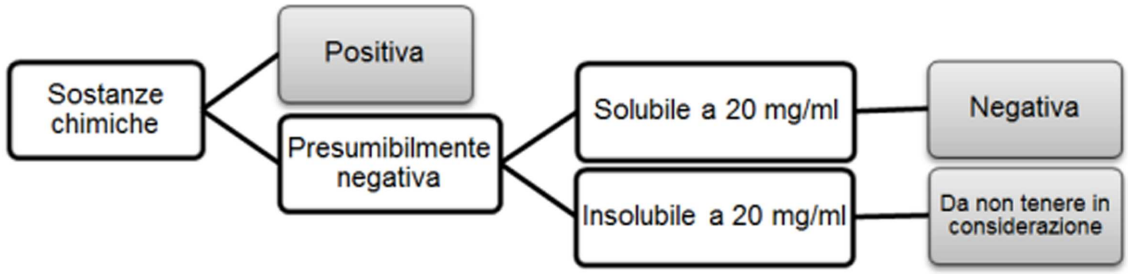
Tabella 2

Criteri di identificazione delle sostanze positive e presumibilmente negative

1ª batteria di prove	2ª batteria di prove	3ª batteria di prove	4ª batteria di prove	Predizione finale
Positiva	Positiva	–	–	Positiva
	Negativa	Positiva	–	Positiva
		Negativa	Positiva	Positiva
			Negativa	Presumibilmente negativa
Negativa	Positiva	Positiva	–	Positiva
		Negativa	Positiva	Positiva
			Negativa	Presumibilmente negativa
	Negativa	Positiva	Positiva	Positiva
			Negativa	Presumibilmente negativa
		Negativa	–	Presumibilmente negativa

Figura 1

Modello predittivo per la decisione finale



Criteri di accettabilità

33. Quando si utilizza il metodo di prova IL-8 Luc devono essere soddisfatti i criteri di accettabilità elencati di seguito:

— il valore Ind-IL8LA deve essere superiore a 5,0 ad almeno una concentrazione del controllo positivo, 4-NBB, in ciascuna batteria di prove;

— il valore Ind-IL8LA deve essere inferiore a 1,4 ad ogni concentrazione del controllo negativo, l'acido lattico, in ciascuna batteria di prove;

— i dati ottenuti da piastre in cui il valore GAPLA dei pozzetti di controllo contenenti cellule e Tripluc, ma non sostanze chimiche, è inferiore a 5 volte il valore del pozzetto che contiene unicamente il mezzo di prova (50 µl/pozzetto di RPMI-1640 contenente 10 % di FBS e 50 µl/pozzetto di X-VIVO™ 15) devono essere scartati;

— i dati ottenuti da piastre in cui il valore Inh-GAPLA di tutte le concentrazioni delle sostanze chimiche in esame o delle sostanze di controllo è inferiore a 0,05 devono essere scartati. In questo caso occorre ripetere la prima prova in modo che la concentrazione finale massima della prova ripetuta corrisponda alla concentrazione finale minima della prova precedente.

Relazione sulla prova

34. La relazione sulla prova comprende le informazioni riportate di seguito.

Sostanze chimiche in esame

Sostanza monocostituente:

— identificazione della sostanza chimica: denominazioni quali i nomi IUPAC o CAS, i numeri CAS, il codice SMILES o InChI, la formula di struttura e/o altri identificatori;

— aspetto fisico, idrosolubilità, peso molecolare, altre proprietà fisico-chimiche pertinenti, se disponibili;

— purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico, ecc.;

— trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione);

— solubilità in X-VIVO™ 15. Per le sostanze chimiche insolubili in X-VIVO™ 15, se si osserva precipitazione o flottazione dopo la centrifugazione;

— concentrazione/i testata/e;

— condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;

— se non è stato utilizzato X-VIVO™ 15, motivazione della scelta del solvente/disperdente per ciascuna sostanza chimica in esame.

Sostanza multicostituente, UVCB o miscela:

— caratterizzazione, nella misura del possibile, ad esempio attraverso l'identità chimica (cfr. sopra), purezza, proporzioni quantitative e proprietà fisico-chimiche pertinenti (cfr. sopra) dei costituenti, secondo i dati disponibili;

— aspetto fisico, idrosolubilità, altre proprietà fisico-chimiche pertinenti, se disponibili;

— peso molecolare o peso molecolare apparente nel caso di miscele/polimeri di composizione nota o altre informazioni pertinenti per la realizzazione dello studio;

— trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione);

— solubilità in X-VIVO™ 15. Per le sostanze chimiche insolubili in X-VIVO™ 15, se si osserva precipitazione o flottazione dopo la centrifugazione;

— concentrazione/i testata/e;

— condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;

— se non è stato utilizzato X-VIVO™ 15, motivazione della scelta del solvente/disperdente per ciascuna sostanza chimica in esame.

Controlli

Controllo positivo:

— identificazione della sostanza chimica: denominazioni quali i nomi IUPAC o CAS, i numeri CAS, il codice SMILES o InChI, la formula di struttura e/o altri identificatori;

— aspetto fisico, idrosolubilità, peso molecolare e proprietà fisico-chimiche pertinenti aggiuntive, se del caso e a seconda dei dati disponibili;

— purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico, ecc.;

— trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione);

— concentrazione/i testata/e;

— condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;

— riferimento ai dati storici relativi ai controlli positivi che dimostrano la conformità ai criteri di accettabilità, se del caso.

Controllo negativo:

— identificazione della sostanza chimica: denominazioni quali i nomi IUPAC o CAS, i numeri CAS e/o altri identificatori;

— purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico, ecc.;

— aspetto fisico, peso molecolare e altre proprietà fisico-chimiche pertinenti, nel caso siano utilizzati controlli negativi diversi da quelli menzionati nelle linee guida e se disponibili;

— condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;

— motivazione della scelta del solvente per ciascuna sostanza chimica in esame.

Condizioni della prova

— nome e indirizzo dello sponsor, dell'infrastruttura utilizzata per la prova e del responsabile dello studio;

— descrizione del sistema di prova utilizzato;

— linea cellulare utilizzata, condizioni di conservazione e provenienza (ad esempio, l'infrastruttura dalla quale provengono le cellule);

— numero di lotto e origine dell'FBS, nome del fornitore, numero di lotto della piastra nera a fondo piatto a 96 pozzetti e numero di lotto del reagente Tripluc;

— numero di passaggi e densità cellulare utilizzata per la prova;

— metodo di conteggio delle cellule utilizzato per l'inoculazione prima della prova e misure prese per assicurare una distribuzione omogenea del numero di cellule;

— luminometro utilizzato (ad esempio il modello), compresi le impostazioni dello strumento, il substrato di luciferasi utilizzato e la dimostrazione della qualità delle misurazioni della luminescenza sulla base della prova descritta nell'appendice 3.2;

— procedura utilizzata per dimostrare la competenza del laboratorio nell'esecuzione della prova (ad esempio sottoponendo la prova a sostanze di riferimento) o per dimostrare la riproducibilità della prova nel tempo.

Procedura

— numero di repliche e di batterie di prove eseguite;

— concentrazioni della sostanza chimica in esame, modalità di applicazione e tempo di esposizione (se diversi da quelli raccomandati);

— descrizione dei criteri di valutazione e di decisione impiegati;

— descrizione dei criteri di accettabilità dello studio;

— descrizione di qualsiasi modifica della procedura sperimentale.

Risultati

— misurazioni di IL8LA e GAPLA;

— calcoli per nIL8LA, Ind-IL8LA e Inh-GAPLA;

— intervallo di confidenza del 95 % di Ind-IL8LA;

— grafico raffigurante le curve dose-risposta per l'induzione dell'attività della luciferasi e la vitalità;

— descrizione di eventuali altre osservazioni pertinenti, se del caso.

Discussione dei risultati

— discussione dei risultati ottenuti con il metodo di prova IL-8 Luc;

— esame dei risultati della prova nel quadro di un approccio di tipo IATA, qualora siano disponibili altre informazioni pertinenti.

Conclusione

BIBLIOGRAFIA

(1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicol Sci 124:359-69.

(2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Consultabile al seguente indirizzo: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Consultabile al seguente indirizzo: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Consultabile al seguente indirizzo: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol 69:371-9.

(6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. Toxicol *In Vitro* 29:1816-30.

(7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, *et al.* (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol 71:337-51.

(8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

(9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147-155.

(10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.

(11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en.

(12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.

(13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.

(14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.

(15) OECD (2017). In attesa di pubblicazione - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OCSE, Parigi, Francia

(16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OCSE, Parigi, Francia.

(17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Consultabile al seguente indirizzo: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, consultabile al seguente indirizzo: http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

(19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046-9.

(20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OCSE, Parigi, Francia.

(21) Nazioni Unite (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1.Consultabile al seguente indirizzo: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

Appendice 3.1

DEFINIZIONI

Accuratezza: grado di concordanza tra i risultati ottenuti con la prova e i valori di riferimento comunemente accettati. Misura l'efficienza della prova e costituisce un aspetto della pertinenza. Il termine è spesso utilizzato come sinonimo di «concordanza», per indicare la proporzione di risultati corretti di una prova (16).

AOP (*Adverse Outcome Pathway*, meccanismo d'azione degli effetti avversi): sequenza di eventi che, a partire dalla struttura chimica di una sostanza chimica bersaglio o di un gruppo di sostanze chimiche simili, attraverso l'evento molecolare scatenante, produce un effetto avverso *in vivo* (20).

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

CV05: vitalità cellulare 05, cioè la concentrazione minima alla quale le sostanze chimiche producono un valore Inh-GAPLA inferiore a 0,05.

FInSLO-LA a: bbreviazione utilizzata nella relazione di validazione e in studi precedenti concernenti il metodo di prova IL-8 Luc per fare riferimento a Ind IL8LA. Cfr. la definizione di Ind-IL8LA.

GAPLA: attività di luciferasi che emette *Stable Luciferase Red* (SLR) (λmax = 630 nm), regolata dal promotore GAPDH, che dimostra la vitalità cellulare e il numero di cellule vitali.

Pericolo: proprietà intrinseca di un agente o di una situazione che ha il potenziale di causare effetti nocivi se un organismo, un sistema o una (sotto-)popolazione vi sono esposti.

IATA (*Integrated Approaches to Testing and Assessment*, approcci integrati in materia di prove e valutazioni): approccio strutturato utilizzato per l'identificazione del pericolo (potenziale), la caratterizzazione del pericolo (potenza) e/o la valutazione della sicurezza (potenziale/potenza ed esposizione) di una sostanza chimica o di un gruppo di sostanze chimiche, che integra in modo strategico e ponderato tutti i dati pertinenti per orientare una decisione di tipo regolamentare concernente il pericolo potenziale e/o il rischio e/o la necessità di effettuare altre prove mirate e, pertanto, limitate allo stretto necessario.

II-SLR-LA: abbreviazione utilizzata nella relazione di validazione e in studi precedenti concernenti il metodo di prova IL-8 Luc per fare riferimento a Inh-GAPLA. Cfr. la definizione di Inh-GAPLA.

IL-8 (Interleuchina-8): citochina derivata da cellule endoteliali, fibroblasti, cheratinociti, macrofagi e monociti che provoca la chemotassi di neutrofili e dei linfociti T.

IL8LA: attività della luciferasi che emette *Stable Luciferase Orange* (SLO) (λmax = 580 nm), regolata dal promotore IL-8.

Ind-IL8LA: variazione di induzione di nIL8LA. Si calcola dividendo il valore nIL8LA delle cellule THP-G8 trattate con le sostanze chimiche per il valore nIL8LA delle cellule THP-G8 non stimolate e rappresenta l'induzione del promotore IL-8 da parte delle sostanze chimiche.

Inh-GAPLA: inibizione di GAPLA. Si calcola dividendo il valore GAPLA delle cellule THP-G8 trattate con sostanze chimiche per il valore GAPLA delle cellule THP-G8 non trattate e rappresenta la citotossicità delle sostanze chimiche.

Soglia minima di induzione (MIT): la concentrazione minima alla quale la sostanza chimica soddisfa il criterio di positività.

Miscela: una miscela o una soluzione composta di due o più sostanze.

Sostanza monocostituente: sostanza, definita attraverso la sua composizione quantitativa, in cui un costituente principale è presente in percentuale pari ad almeno 80 % (p/p).

Sostanza multicostituente: sostanza, definita attraverso la sua composizione quantitativa, in cui più di un costituente principale è presente in concentrazione ≥ 10 % (p/p) e < 80 % (p/p). Una sostanza multicostituente è il risultato di un processo di fabbricazione. La differenza tra miscela e sostanza multicostituente è che una miscela è ottenuta attraverso la miscelazione di due o più sostanze senza che avvenga una reazione chimica. Una sostanza multicostituente è il risultato di una reazione chimica.

nIL8LA: l'attività della luciferasi SLO che rispecchia l'attività del promotore IL 8 (IL8LA) normalizzata dall'attività della luciferasi SLR che rispecchia l'attività del promotore GAPDH (GAPLA). Rappresenta l'attività del promotore IL-8 tenendo in considerazione la vitalità cellulare o il numero delle cellule.

nSLO-LA: abbreviazione utilizzata nella relazione di validazione e in studi precedenti concernenti il metodo di prova IL-8 Luc per fare riferimento a nIL8LA. Cfr. la definizione di nIL8LA.

Controllo positivo: replica contenente tutti i componenti di un sistema di prova, trattata con una sostanza che notoriamente induce una risposta positiva. Perché sia possibile valutare la variabilità nel tempo della risposta del controllo positivo, l'intensità di tale risposta non dovrebbe essere eccessiva.

Preapteni: sostanze chimiche che diventano sensibilizzanti tramite trasformazione abiotica.

Proapteni: sostanze chimiche che necessitano di un'attivazione enzimatica per dispiegare il loro potenziale di sensibilizzazione cutanea.

Pertinenza: descrizione del rapporto tra la prova e l'effetto ricercato; indica se la prova è significativa e utile per uno scopo specifico. È il grado con cui la prova misura o prevede correttamente l'effetto biologico di interesse. La pertinenza comprende una valutazione dell'accuratezza (concordanza) di una prova (16).

Affidabilità: misura in cui una prova può essere riprodotta nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi utilizzando il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità interna ai laboratori e la ripetibilità fra i laboratori (16).

Batteria di prove: una batteria di prove consiste nel testare una o più sostanze chimiche in esame simultaneamente a un controllo con solvente/disperdente e a un controllo positivo.

Sensibilità: proporzione di tutte le sostanze chimiche positive/attive correttamente classificate dalla prova. Misura l'accuratezza di una prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di una prova (16).

SLO-LA: abbreviazione utilizzata nella relazione di validazione e in studi precedenti concernenti il metodo di prova IL-8 Luc per fare riferimento a IL8LA. Cfr. la definizione di IL8LA.

SLR-LA: abbreviazione utilizzata nella relazione di validazione e in studi precedenti concernenti il metodo di prova IL-8 Luc per fare riferimento a GAPLA. Cfr. la definizione di GAPLA.

Controllo con solvente/disperdente: campione non trattato contenente tutti i componenti di un sistema di prova, esclusa la sostanza chimica in esame, ma incluso il solvente/disperdente utilizzato. È utilizzato per stabilire la risposta di base per i campioni trattati con la sostanza chimica in esame disciolta o in dispersione stabile nello stesso solvente/disperdente. Se testato in concomitanza con un controllo con mezzo, questo campione dimostra anche se il solvente/disperdente interagisce con il sistema di prova.

Specificità: proporzione di tutte le sostanze chimiche negative/inattive correttamente classificate dalla prova. Misura l'accuratezza di una prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di una prova (16).

Sostanza: elemento chimico e suoi composti allo stato naturale o ottenuti mediante un processo di produzione, compresi gli additivi necessari a conservare la stabilità del prodotto e le impurezze derivanti dal processo utilizzato, ma esclusi i solventi che possono essere separati senza ripercussioni sulla stabilità della sostanza o modifiche della sua composizione.

Tensioattivo: denominato anche surfattante, è una sostanza, come un detergente, in grado di ridurre la tensione superficiale di un liquido consentendo quindi di formare schiuma o di penetrare solidi; è noto anche come agente umettante. (TG n. 437)

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata applicando il presente metodo di prova.

THP-G8: linea cellulare reporter IL-8 utilizzata nel metodo di prova IL-8 Luc. La linea cellulare umana macrofagica THP-1 è stata trasfettata con i geni della luciferasi SLO e SLR sotto il controllo dei promotori IL-8 e GAPDH, rispettivamente.

Sistema globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (UN GHS): sistema di classificazione delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) secondo tipi e livelli standardizzati di rischio fisico, sanitario e ambientale, che elabora i relativi elementi di comunicazione, quali pittogrammi, avvertenze, indicazioni di pericolo, consigli di prudenza e schede informative di sicurezza, per trasmettere informazioni sugli effetti avversi di dette sostanze a tutela delle persone (compresi datori di lavoro, lavoratori, trasportatori, consumatori e personale di pronto intervento) e dell'ambiente (21).

UVCB: sostanze la cui composizione non è conosciuta o è variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali origine biologica.

Metodo di prova valido: metodo di prova la cui pertinenza e affidabilità sono ritenute soddisfacenti per uno scopo specifico e che si fonda su principi scientificamente provati. Un metodo di prova non è mai valido in assoluto ma solo in relazione a un determinato scopo.

Appendice 3.2

PRINCIPIO DI MISURAZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLA LUCIFERASI E DETERMINAZIONE DEI COEFFICIENTI DI TRASMISSIONE DEI FILTRI OTTICI PER SLO E SLR

Il sistema di prova MultiReporter - Tripluc - può essere utilizzato con un luminometro per micropiastre dotato di un sistema di rilevazione policromatico con filtro ottico [ad es. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)]. Il filtro ottico utilizzato per la misurazione è un filtro passa-alto o passa-basso di 600–620 nm o un filtro passa-banda di 600–700 nm.

Misurazione di luciferasi bicromatiche con un filtro ottico

L'esempio che segue è realizzato con un apparecchio AB-2350 (ATTO). Questo luminometro è dotato di un filtro passa-alto di 600 nm (R60 HOYA Co., 600 nm LP, filtro 1) che consente di separare la luminescenza SLO (λmax = 580 nm) dalla luminescenza SLR (λmax = 630 nm).

Per determinare i coefficienti di trasmissione del filtro 600 nm LP si utilizzano in primo luogo enzimi luciferasi SLO e SLR purificati per i) misurare l'intensità di bioluminescenza di SLO e SLR senza filtro (F0), ii) misurare l'intensità di bioluminescenza di SLO e SLR che attraversa il filtro 600 nm LP (filtro 1), e iii) calcolare i coefficienti di trasmissione del filtro 600 nm LP per SLO e SLR indicati di seguito.

Transmission coefficients		Abbreviation	Definition
SLO	Filter 1 Transmission coefficients	$=\kappa O_{R60}$	The filter's transmission coefficient for the SLO
SLR	Filter 1 Transmission coefficients	κR_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLR

Se l'intensità di SLO e SLR nel campione di prova è definita rispettivamente come O e R, i) l'intensità della luce senza filtro (sistema interamente ottico) F0 e ii) l'intensità della luce trasmessa attraverso il filtro 600 nm LP (filtro 1) F1 sono descritte come segue.

$F0 = O + R$

$F1 = \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$

Tali formule possono essere esplicitate come segue:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Quindi, a partire dai fattori di trasmittanza calcolati (κO_{R60} e κR_{R60}) e dai valori F0 e F1 misurati, è possibile calcolare i valori O e R come segue:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Materiali e metodi per la determinazione del fattore di trasmittanza

(1) Reagenti

Enzimi luciferasi purificati:

enzima SLO purificato liofilizzato

enzima SLR purificato liofilizzato

(nello studio di validazione gli enzimi sono stati ottenuti dal laboratorio GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Giappone, con una linea cellulare THP-G8)

Reagente della prova:

Tripluc® Luciferase (ad esempio da TOYOBO Cat#MRA-301)

Mezzo: per la prova della luciferasi (30 ml, conservato a 2 - 8 °C)

Reagente	Concentrazione	Concentrazione finale nel mezzo	Volume necessario
RPMI-1640	—	—	27 ml
FBS	—	10 %	3 ml

(2) Preparazione della soluzione enzimatica:

Sciogliere l'enzima luciferasi purificato liofilizzato in una provetta aggiungendo 200 µl di 10 ~ 100 mM Tris/HCl o Hepes/HCl (pH 7,5 ~ 8,0) con aggiunta di 10 % (p/v) di glicerolo, suddividere la soluzione enzimatica in aliquote da 10 µl in provette monouso da 1,5 ml e riporre in congelatore a -80 °C. La soluzione enzimatica congelata può essere utilizzata per un massimo di 6 mesi. Per utilizzare la soluzione, aggiungere 1 ml di mezzo della prova di luciferasi (RPMI-1640 con 10 % di FBS) a ciascuna provetta contenente la soluzione enzimatica (soluzione enzimatica diluita) e conservare le provette su ghiaccio per evitare la disattivazione.

(3) Misurazione della bioluminescenza

Scongelare il reagente della prova di luciferasi Tripluc® (Tripluc) e conservarlo a temperatura ambiente a bagnomaria o all'aria. Accendere il luminometro 30 minuti prima di iniziare la misurazione per consentire la stabilizzazione del fotomoltiplicatore. Trasferire 100 µl di soluzione enzimatica diluita in una piastra nera a fondo piatto a 96 pozzetti (campione di riferimento SLO in #B1, #B2, #B3, campione di riferimento SLR in #D1, #D2, #D3). Quindi, per mezzo di una pipetta automatica, trasferire 100 µl di Tripluc preriscaldato in ciascun pozzetto della piastra contenente la soluzione enzimatica diluita. Agitare la piastra per 10 minuti a temperatura ambiente (25 °C circa) su un agitatore per piastre. Asportare eventuali bolle dalle soluzioni contenute nei pozzetti. Collocare la piastra nel luminometro per misurare l'attività della luciferasi. La bioluminescenza è misurata per 3 secondi senza filtro ottico (F0) e per altri 3 secondi con filtro ottico (F1).

Il coefficiente di trasmissione del filtro ottico è stato calcolato come segue:

coefficiente di trasmissione (SLO (κO_{R60}))= (#B1 di F1+ #B2 di F1+ #B3 di F1) / (#B1 di F0+ #B2 di F0+ #B3 of F0)

coefficiente di trasmissione (SLR (κR_{R60}))= (#D1 di F1+ #D2 di F1+ #D3 di F1) / (#D1 di F0+ #D2 di F0+ #D3 of F0)

I fattori di trasmittanza calcolati sono utilizzati per tutte le misurazioni realizzate con lo stesso luminometro.

Controllo di qualità dell'attrezzatura

Devono essere utilizzate le procedure descritte nel protocollo IL-8 Luc (18).

Appendice 3.3

SOSTANZE CHIMICHE PER LA VERIFICA DELLA COMPETENZA TECNICA

Prima di utilizzare come test di routine la prova descritta nella presente appendice per il metodo di prova B.71, i laboratori sono tenuti a dimostrare la loro competenza tecnica ottenendo la predizione attesa con il metodo di prova IL-8 Luc per le 9 sostanze raccomandate nella tabella 1 e ottenendo valori che rientrino nel rispettivo intervallo di riferimento per almeno 8 delle 9 sostanze di riferimento (selezionate in modo da rappresentare la gamma delle risposte corrispondenti ai pericoli di sensibilizzazione cutanea). Altri criteri di selezione riguardavano la disponibilità in commercio delle sostanze e la disponibilità di dati di riferimento *in vivo* e di dati *in vitro* di elevata qualità ottenuti con il metodo di prova IL-8 Luc. Sono inoltre disponibili dati di riferimento pubblicati per il metodo di prova IL-8 Luc (6) (1).

Tabella 1

Sostanze raccomandate per la verifica della competenza tecnica con il metodo di prova IL-8 Luc

Sostanze di prova per la verifica della competenza	N. CAS	Stato	Solubilità in X-VIVO15 a 20 mg/ml	Predizione *in vivo* (1)	Predizione IL-8 Luc (2)	Intervallo di riferimento (µg/ml) (3)	
						CV_{05} (4)	IL-8 Luc MIT (5)
2,4-Dinitroclorobenzene	97-00-7	Solido	Insolubile	Sensibilizzante (estremamente elevato)	Positivo	2,3-3,9	0,5-2,3
Formaldeide	50-00-0	Liquido	Solubile	Sensibilizzante (elevato)	Positivo	9-30	4-9
2-Mercaptobenzotiazolo	149-30-4	Solido	Insolubile	Sensibilizzante(moderato)	Positivo	250-290	60-250
Etilendiammina	107-15-3	Liquido	Solubile	Sensibilizzante (moderato)	Positivo	500-700	0,1-0,4
Etilene glicol dimetacrilato	97-90-5	Liquido	Insolubile	Sensibilizzante (debole)	Positivo	>2000	0,04-0,1
4-Allilanisolo (estragolo)	140-67-0	Liquido	Insolubile	Sensibilizzante (debole)	Positivo	>2000	0,01-0,07
Solfato di streptomicina	3810-74-0	Solido	Solubile	Non sensibilizzante	Negativo	>2000	>2000
Glicerolo	56-81-5	Liquido	Solubile	Non sensibilizzante	Negativo	>2000	>2000
Isopropanolo	67-63-0	Liquido	Solubile	Non sensibilizzante	Negativo	>2000	>2000

Abbreviazioni: N. CAS (*Chemical Abstracts Service Registry Number*) = Numero CAS (numero di registrazione nell'inventario europeo delle sostanze chimiche).
(1) La potenza *in vivo* è determinata mediante criteri proposti da ECETOC (19).
(2) Sulla base dei dati storici osservati (1) (6).
(3) I valori CV_{05} e IL-8 Luc MIT sono stati calcolati sulla base dell'idrosolubilità indicata dal programma EPI Suite™.
(4) CV_{05}: la concentrazione minima alla quale le sostanze chimiche producono un valore Inh-GAPLA inferiore a 0,05.
(5) MIT: le concentrazioni minime alle quali la sostanza chimica soddisfa il criterio di positività.

Appendice 3.4

INDICI E CRITERI DI VALUTAZIONE

nIL8LA (nSLO-LA)

La j-esima ripetizione (j = 1 - 4) della i-esima concentrazione (i = 0 - 11) è misurata per IL8LA (SLO-LA) e GAPLA (SLR-LA) rispettivamente. Il valore IL8LA normalizzato, detto nIL8LA (nSLO-LA), è definito come segue:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Si tratta dell'unità di misura di base per questo metodo di prova.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

L'aumento del valore medio nIL8LA (nSLO-LA) per la ripetizione alla i-esima concentrazione rispetto alla concentrazione 0, Ind-IL8LA, è la misura principale di questo metodo di prova. Tale rapporto è espresso dalla formula seguente:

$$\mathrm{Ind}-\mathrm{IL8LA_i} = \left\{(1/4)\times\sum_{j}\mathrm{nIL8LA_{ij}}\right\}/\left\{(1/4)\times\sum_{j}\mathrm{nIL8LA_{0j}}\right\}$$

Il laboratorio principale ha proposto che un valore di 1,4 corrisponda a un risultato positivo per la sostanza chimica in esame. Tale valore è basato sullo studio dei dati storici del laboratorio principale. L'équipe che si occupa della gestione dei dati ha utilizzato tale valore in tutte le fasi dello studio di validazione. Come risulta dall'equazione, il risultato principale, Ind-IL8LA, è il rapporto di 2 medie aritmetiche.

Intervallo di confidenza del 95 % (CI 95 %)

La precisione della misura di tale risultato principale è stimata mediante l'intervallo di confidenza del 95 % (CI 95 %) basato sul rapporto. Il limite inferiore di CI 95 % ≥ 1 indica che il valore nIL8LA alla i-esima concentrazione è significativamente più elevato del valore ottenuto con il controllo con solvente. L'intervallo di confidenza CI 95 % può essere ricavato in diversi modi. Nel presente studio è stato utilizzato il metodo noto come teorema di Fieller, secondo cui l'intervallo di confidenza del 95 % è calcolato mediante la formula seguente:

$$\left[\frac{-\mathrm{B}-\sqrt{\mathrm{B}^2-4\mathrm{AC}}}{2\mathrm{A}},\frac{-\mathrm{B}+\sqrt{\mathrm{B}^2-4\mathrm{AC}}}{2\mathrm{A}}\right],$$

in cui

$$\mathrm{A} = \overline{\mathrm{x}}_0^2 - \mathrm{t}_{0,975(\nu)}^2 \times \frac{\mathrm{sd}_0^2}{\mathrm{n}_0};$$

$$\mathrm{B} = -2 \times \overline{\mathrm{x}} \times \overline{\mathrm{y}};$$

$C = \overline{y}_i^2 - t_{0.975(\nu)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}$; $n_0 = 4$,

$\overline{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}$,

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \overline{x}_0)^2$,

$n_{yi} = 4$,

$\overline{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$,

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \overline{y}_i)^2$.

$t_{0,975(\nu)}$ è il 97,5° percentile della distribuzione t centrale con il valore ν del grado di libertà, in cui

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Il valore Inh-GAPLA è il rapporto del valore GAPLA medio (SLR-LA) per la ripetizione della i-esima concentrazione rispetto al valore ottenuto con il controllo con solvente, ed è espresso alla seguente formula:

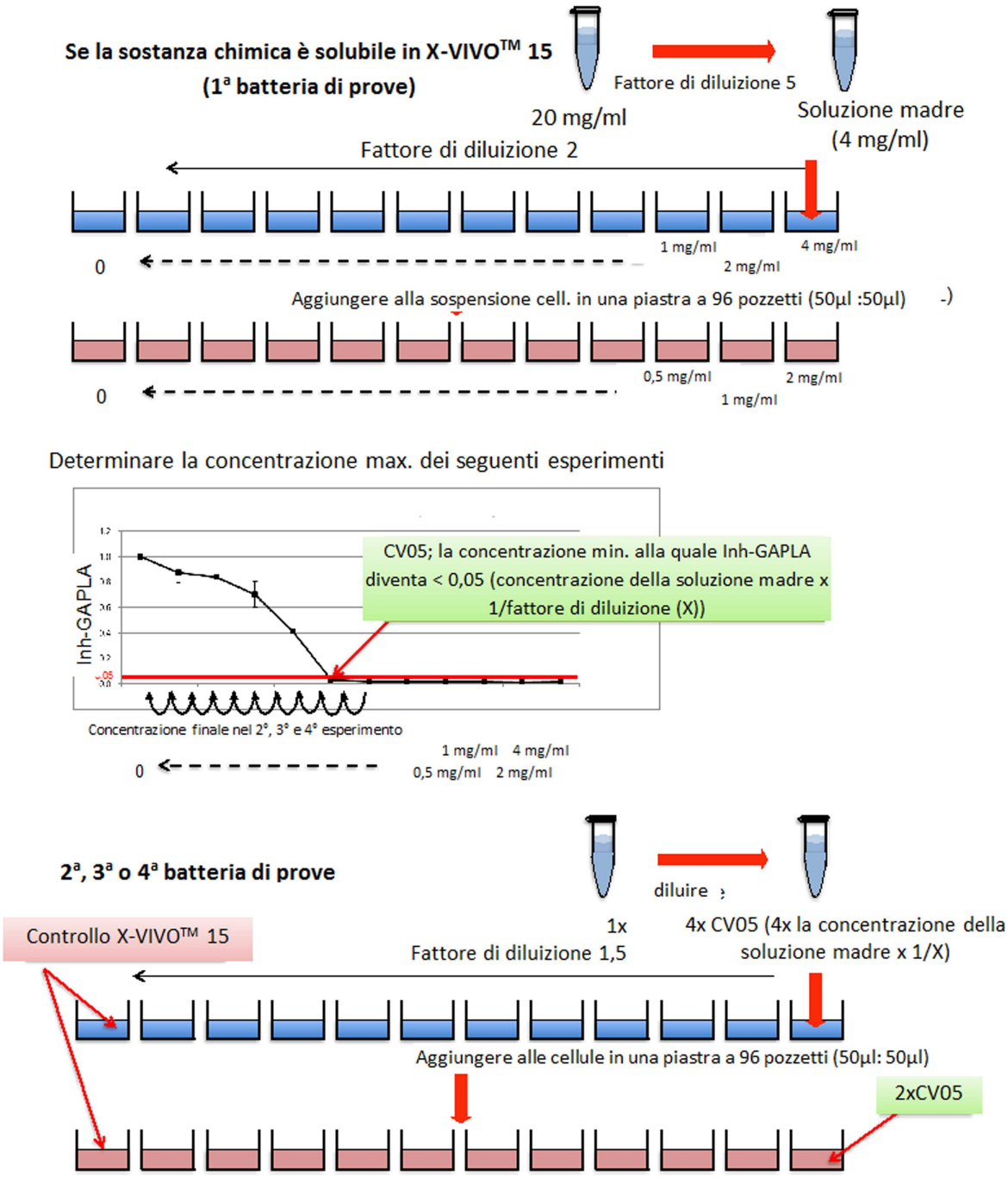
$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

Essendo GAPLA il denominatore di nIL8LA, un valore estremamente basso determina una grande variazione di nIL8LA. Pertanto i valori Ind-IL8LA con un valore Inh-GAPLA estremamente basso (inferiore a 0,05) vanno considerati di scarsa precisione.

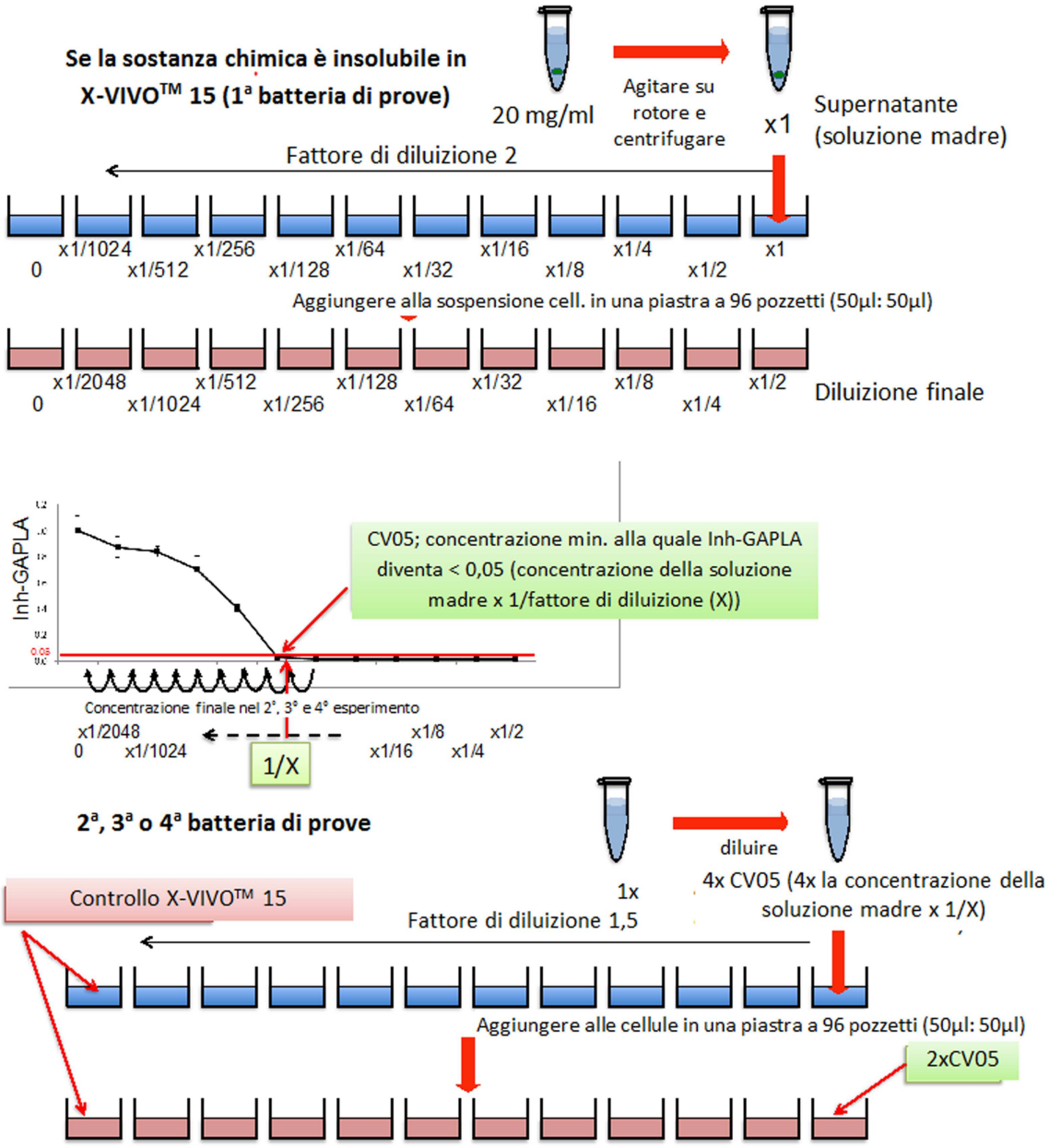
Appendice 3.5

SCHEMA DEI METODI DI DISSOLUZIONE DELLE SOSTANZE CHIMICHE PER IL METODO DI PROVA IL-8 LUC

(a) Per le sostanze chimiche disciolte in X-VIVO™ 15 a 20 mg/ml

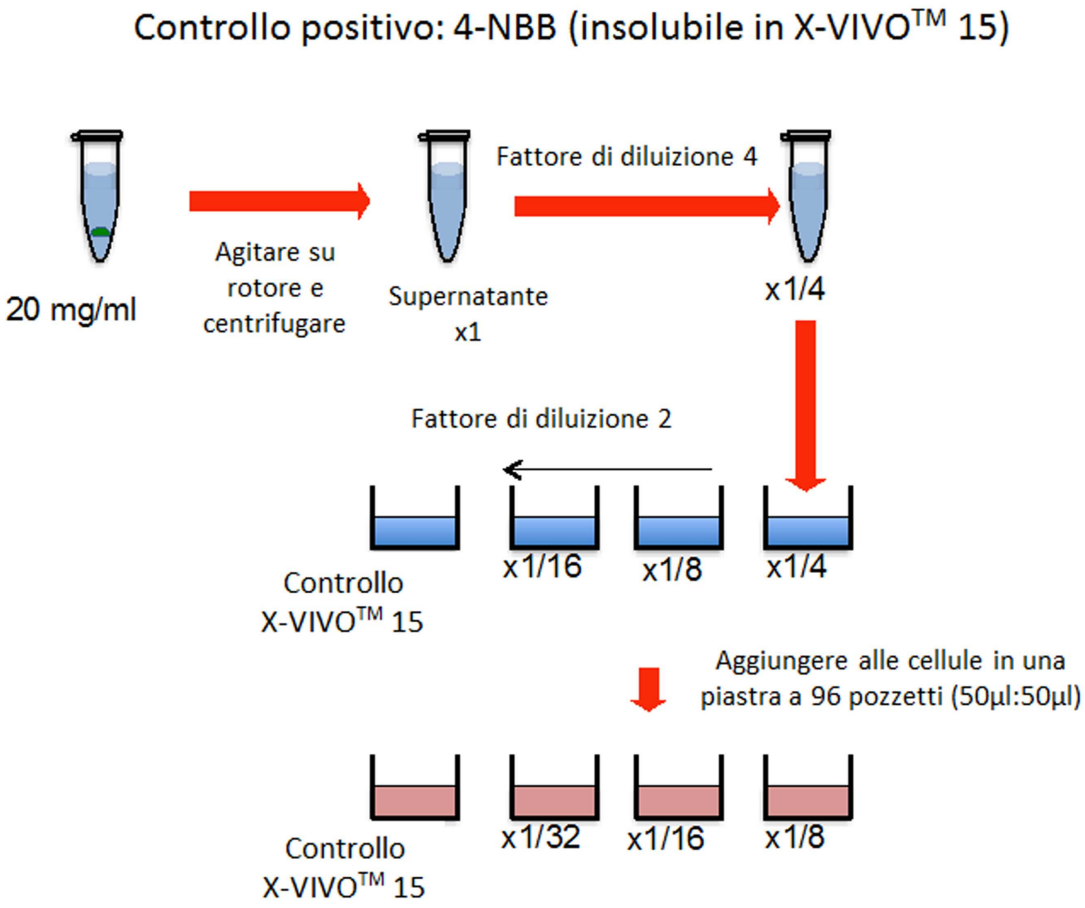


(b) Per le sostanze chimiche insolubili in X-VIVO™ 15 a 20 mg/ml



Appendice 3.6

SCHEMA DEL METODO DI DISSOLUZIONE DEL 4-NBB PER IL CONTROLLO POSITIVO PER IL METODO DI PROVA IL-8 LUC



"

9) Nella parte C sono aggiunti i seguenti capitoli:

"C.52 **PROVA ESTESA DI RIPRODUZIONE SU UNA GENERAZIONE DI MEDAKA (MEOGRT)**

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 240 (2015). La prova estesa di riproduzione su una generazione di Medaka (MEOGRT) descrive un metodo di prova completo basato su pesci esposti per più generazioni al fine di fornire dati pertinenti per la valutazione dei pericoli e dei rischi per l'ambiente legati alle sostanze chimiche, comprese le sostanze chimiche sospettate di essere interferenti endocrini (EDC). Nella prova MEOGRT l'esposizione continua fino alla schiusa [fino a due settimane dopo la fecondazione (sdf)] nella seconda generazione (F2). Ulteriori indagini sarebbero necessarie per giustificare l'utilità di un'eventuale estensione della generazione F2 oltre la schiusa; allo stadio attuale le informazioni sono insufficienti per fornire condizioni o criteri pertinenti per giustificare l'estensione della generazione F2. Questo metodo di prova potrà tuttavia essere aggiornato in funzione di nuovi dati e informazioni. Ad esempio, orientamenti sull'estensione della generazione F2 fino alla riproduzione possono essere utili in determinate circostanze (ad es. sostanze chimiche con elevato potenziale di bioconcentrazione o indicazioni di effetti transgenerazionali in altri taxa). Questo metodo di prova può essere utilizzato per valutare i potenziali effetti cronici delle sostanze chimiche, compresi i potenziali interferenti endocrini, sui pesci. Il metodo concerne principalmente i potenziali effetti a livello di popolazione (ossia le conseguenze negative su sopravvivenza, sviluppo, crescita e riproduzione) per il calcolo della concentrazione senza effetti osservabili (NOEC - *No Observed Effect Concentration*) o della concentrazione efficace (EC_x - *Effect Concentration*), anche se va notato che gli approcci EC_x sono raramente adatti a studi estesi di questo tipo, in cui l'aumento del numero di concentrazioni di prova per determinare la concentrazione efficace desiderata può non risultare pratico e può inoltre causare notevoli preoccupazioni sotto il profilo del benessere animale, visto il gran numero di animali utilizzati. Altri metodi di prova possono risultare più appropriati per le sostanze chimiche che non richiedono una valutazione multigenerazionale o per le sostanze chimiche che non sono potenzialmente in grado di alterare il sistema endocrino (1). Il medaka giapponese è la specie appropriata da utilizzare in questo metodo di prova data la brevità del suo ciclo vitale e la possibilità di determinarne il sesso genetico (2), che è considerata una componente essenziale di questo metodo di prova. I metodi specifici e gli endpoint di osservazione descritti in questo metodo si applicano esclusivamente al medaka giapponese. Altre specie ittiche di piccola taglia (ad es. il *Danio rerio*) possono essere adatte a un protocollo di prova analogo.

2. Questo metodo di prova misura diversi endpoint biologici. Esso riguarda principalmente i potenziali effetti negativi sui parametri pertinenti per la popolazione, fra cui sopravvivenza, sviluppo macroscopico, crescita e riproduzione. In secondo luogo, al fine di disporre di dati meccanicistici e di stabilire collegamenti tra i risultati di altri tipi di studi sul campo e di laboratorio, se esistono prove che stabiliscono *a posteriori* che una sostanza chimica è un interferente endocrino potenziale (ad es. svolge attività androgenica o estrogenica in altre prove o saggi), allora altre informazioni utili si ottengono misurando l'mRNA della *vitellogenina* (*vtg)* (o la proteina vitellogenina, VTG), i caratteri sessuali secondari (CSS) fenotipici legati al sesso genetico e procedendo a una valutazione istopatologica. Va notato che se una sostanza chimica in esame o i suoi metaboliti non sono sospettati di essere interferenti endocrini, può non essere necessario misurare questi endpoint secondari e possono risultare più appropriati studi che richiedono meno risorse e un minor numero di animali (1). Le definizioni dei termini utilizzati nel presente metodo di prova figurano nell'appendice 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

3. A causa del numero limitato di sostanze chimiche sottoposte a prova e dei laboratori partecipanti alla validazione di questa prova piuttosto complessa, si prevede che, quando sarà disponibile un numero sufficiente di studi per accertare l'impatto di questo nuovo disegno sperimentale, il metodo di prova sarà riesaminato e, se necessario, riveduto alla luce dell'esperienza acquisita. I dati possono essere utilizzati al livello 5 del quadro concettuale dell'OCSE per la prova e la valutazione degli interferenti endocrini (3). Il metodo di prova inizia esponendo pesci adulti (generazione F0) alla sostanza chimica in esame nella fase di riproduzione. L'esposizione continua durante lo sviluppo e la riproduzione nella generazione F1 e durante la schiusa nella generazione F2; in questo modo la prova permette di valutare le vie endocrine strutturali e attivazionali. Nell'interpretare gli endpoint endocrini si può adottare un approccio basato sul peso dell'evidenza.

4. La prova deve comprendere un numero adeguato di individui per assicurare una potenza sufficiente per la valutazione degli endpoint pertinenti per la riproduzione (cfr. l'appendice 3), garantendo nel contempo che il numero di animali utilizzati sia il minimo necessario per motivi di benessere degli animali. Considerato il numero elevato di animali utilizzati nella prova, è importante valutare attentamente la necessità della prova in relazione ai dati esistenti, che potrebbero già contenere informazioni pertinenti su molti degli endpoint della prova MEOGRT. Un aiuto al riguardo può essere ottenuto dal documento dell'OCSE *Fish Toxicity Testing Framework* (1).

5. Il metodo di prova è stato elaborato principalmente per distinguere gli effetti di un'unica sostanza. Se tuttavia è richiesta una prova su una miscela, si deve considerare se fornirà risultati accettabili per i fini regolamentari previsti.

6. Prima di iniziare la prova è importante disporre di informazioni sulle proprietà fisico-chimiche della sostanza chimica in esame, in particolare per rendere possibile la produzione di soluzioni chimiche stabili. È inoltre necessario disporre di un metodo analitico adeguatamente sensibile per verificare le concentrazioni delle sostanze chimiche in esame.

PRINCIPIO DELLA PROVA

7. La prova ha inizio esponendo maschi e femmine sessualmente maturi (almeno 12 settimane dopo la fecondazione), riuniti in coppie riproduttrici, per 3 settimane, durante le quali la sostanza chimica in esame è distribuita nell'organismo della generazione parentale (F0) in base al suo comportamento tossicocinetico. Il primo giorno della quarta settimana, o quanto più vicino possibile a tale data, si raccolgono le uova per avviare la generazione F1. Durante l'allevamento della generazione F1 (un totale di 15 settimane) sono valutati il tasso di schiusa e di sopravvivenza. Inoltre 9-10 settimane dopo la fecondazione si prelevano campioni di pesci per gli endpoint di sviluppo e si valuta l'ovodeposizione per tre settimane, tra la 12ª e la 14ª settimana dopo la fecondazione. Una generazione F2 è avviata dopo la terza settimana di valutazione della riproduzione ed è allevata fino al completamento della schiusa delle uova.

CRITERI DI VALIDITÀ DELLA PROVA

8. Si applicano i seguenti criteri di validità della prova:

— la concentrazione dell'ossigeno disciolto deve essere ≥ 60 % del valore di saturazione in aria durante tutta la prova;

— la temperatura media dell'acqua per tutta la durata dello studio deve essere compresa fra 24 e 26 °C. Brevi scarti dalla media in singole vasche non devono superare i 2 °C;

— la fecondità media dei controlli in ciascuna delle generazioni (F0 e F1) deve essere superiore a 20 uova per coppia al giorno. La fertilità di tutte le uova prodotte durante la valutazione deve essere superiore all'80 %. Inoltre 16 delle 24 coppie riproduttrici di controllo raccomandate (> 65 %) devono produrre più di 20 uova per coppia al giorno;

— il tasso di schiusa delle uova deve essere ≥ 80 % (in media) nei controlli (in ciascuna delle generazioni F1 e F2);

— la sopravvivenza dopo la schiusa fino a 3 settimane dopo la fecondazione e da 3 settimane dopo la fecondazione fino alla soppressione non cruenta per la generazione F1 (ossia 15 settimane dopo la fecondazione) deve essere, rispettivamente, ≥ 80 % (media) e ≥ 90 % (media) nei controlli (F1);

— i dati disponibili devono dimostrare che le concentrazioni della sostanza chimica in esame in soluzione sono state mantenute in modo soddisfacente entro un intervallo del ± 20 % dei valori medi misurati.

Per quanto riguarda la temperatura dell'acqua, anche se non costituisce un criterio di validità, le repliche all'interno di un trattamento non devono essere statisticamente diverse le une dalle altre e i gruppi trattati nell'ambito della prova non devono essere statisticamente diversi gli uni dagli altri (sulla base di una misurazione quotidiana delle temperature ed esclusi scarti di breve durata).

9. Benché si possa osservare un calo della riproduzione nei gruppi esposti alle concentrazioni più elevate, la riproduzione deve essere sufficiente, almeno nel terzo gruppo più esposto e in tutti i gruppi meno esposti della F0, per riempire gli incubatori di schiusa. Inoltre la sopravvivenza embrionale nel terzo gruppo più esposto e nei gruppi meno esposti della generazione F1 deve essere tale da consentire la valutazione degli endpoint al momento del campionamento subadulto (cfr. i paragrafi 36 e 38 e l'appendice 9). Inoltre si deve osservare almeno una minima sopravvivenza post-schiusa (~20 %) nel secondo gruppo più esposto della F1. Questi non costituiscono di per sé criteri di validità, ma raccomandazioni intese a consentire il calcolo delle concentrazioni senza effetti osservabili (NOEC) su basi solide.

10. Se si registra una deviazione rispetto ai criteri di validità della prova, le conseguenze devono essere analizzate in relazione all'attendibilità dei risultati della prova e tali deviazioni e considerazioni devono essere incluse nella relazione sulla prova.

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiature

11. Normale attrezzatura da laboratorio e in particolare:

a) misuratori dell'ossigeno e del pH;

b) attrezzatura per la determinazione della durezza e dell'alcalinità dell'acqua;

c) apparecchiatura adeguata per il controllo della temperatura e preferibilmente per il monitoraggio continuo;

d) vasche in materiale chimicamente inerte e di capacità adeguata in relazione al carico e alla densità di popolazione raccomandati (cfr. appendice 3);

e) bilancia sufficientemente precisa (precisione di ± 0,5 mg).

Acqua

12. Per la prova si può utilizzare qualunque tipo di acqua in cui la specie sperimentale dimostri di sopravvivere a lungo termine e di crescere in modo adeguato. La qualità dell'acqua deve essere costante per tutta la durata della prova. Per escludere l'eventualità che l'acqua di diluizione influisca indebitamente sui risultati della prova (ad esempio, per complessazione della sostanza chimica in esame) o abbia effetti negativi sui pesci riproduttori, si prelevano periodicamente dei campioni per analizzarla. La misurazione dei metalli pesanti (ad es. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), dei principali anioni e cationi (ad es. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, $SO_4{}^{2-}$), dei pesticidi, del carbonio organico totale e dei solidi in sospensione deve essere effettuata, ad esempio, ogni sei mesi, quando sia noto che l'acqua di diluizione è di qualità relativamente costante. Alcune caratteristiche chimiche di un'acqua di diluizione accettabile sono elencate nell'appendice 2. Il pH dell'acqua deve essere compreso tra 6,5 e 8,5, ma nel corso della medesima prova deve essere compreso entro un intervallo di ± 0,5 unità di pH.

Sistema di esposizione

13. Il disegno e i materiali utilizzati per il sistema di esposizione non sono specificati. Per la costruzione del sistema di prova si devono utilizzare vetro, acciaio inossidabile o altri materiali chimicamente inerti che non siano stati contaminati in prove precedenti. Ai fini della presente prova un sistema di esposizione adeguato potrà essere costituito da un sistema a flusso continuo (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13).

Soluzioni di prova

14. La soluzione madre della sostanza chimica in esame deve essere introdotta nel sistema di esposizione mediante una pompa adeguata. La portata del flusso della soluzione madre deve essere calibrata secondo i dati analitici delle soluzioni di prova prima dell'inizio dell'esposizione e formare oggetto di un controllo volumetrico periodico durante la prova. La soluzione di prova in ogni vasca è rinnovata secondo il bisogno (ad es. minimo 5 rinnovi in volume/giorno fino a 16 rinnovi in volume/giorno o un flusso fino a 20 ml/min) in funzione della stabilità della sostanza chimica in esame e della qualità dell'acqua.

15. Le soluzioni di prova alle concentrazioni scelte vanno preparate per diluizione di una soluzione madre. La soluzione madre è di preferenza preparata semplicemente miscelando o agitando la sostanza chimica in esame nell'acqua di diluizione con mezzi meccanici (agitazione e/o ultrasuoni, ad esempio). Per ottenere una concentrazione adeguata della soluzione madre si possono utilizzare colonne/sistemi di saturazione o metodi di dosaggio passivo (14). Si deve tuttavia cercare, in via prioritaria, di evitare solventi e altri vettori, in quanto: 1) alcuni solventi possono essi stessi rivelarsi tossici e/o indurre risposte indesiderate o inattese, 2) testare le sostanze chimiche a una concentrazione superiore alla loro solubilità in acqua (il che avviene spesso se si usano solventi) può falsare la determinazione delle concentrazioni efficaci, 3) il ricorso a solventi nelle prove a lungo termine può portare alla formazione significativa di biofilm associati all'attività microbica che può avere un impatto sulle condizioni ambientali e sulla capacità di mantenere le concentrazioni di esposizione e 4) in assenza di dati storici che dimostrino che il solvente non influisce sui risultati dello studio, l'uso di solventi necessita il trattamento con solvente di un controllo, con le relative conseguenze a livello di benessere degli animali, in quanto sono necessari animali supplementari per svolgere la prova. Nel caso di sostanze chimiche difficili da testare, il solvente può essere utilizzato soltanto come ultima istanza e si deve consultare il documento d'orientamento dell'OCSE 23 sulle prove di tossicità in ambiente acquatico di sostanze o miscele "difficili" (*OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*) (15) per stabilire la migliore metodologia da seguire. La scelta del solvente sarà determinata dalle proprietà chimiche della sostanza chimica in esame e dalla disponibilità di dati storici sull'uso del solvente. Inoltre, se si utilizza un solvente come vettore, occorre valutare idonei controlli con solvente in aggiunta ai controlli (negativi) senza solvente (solo acqua di diluizione). Nel caso in cui l'uso di un solvente sia inevitabile e si verifichi un'attività microbica (biofilm), si raccomanda di registrare/annotare la presenza di biofilm per vasca durante tutta la durata della prova. Idealmente la concentrazione di solvente deve essere mantenuta costante nel controllo con solvente e in tutti i recipienti trattati. Se la concentrazione di solvente non è mantenuta costante, nel controllo con solvente deve essere utilizzata la concentrazione di solvente più elevata nel recipiente trattato. Nei casi in cui si utilizza un solvente come vettore, la concentrazione massima del solvente non deve superare 100 µl/l o 100 mg/l (15) e si raccomanda di mantenere la concentrazione del solvente più bassa possibile (ad es. < 20 µl/l) per evitare il potenziale effetto del solvente sugli endpoint misurati (16).

Animali sperimentali

Selezione e mantenimento dei pesci

16. La specie sperimentale è il medaka giapponese *Oryzias latipes* a motivo del ciclo vitale breve e della possibilità di determinare il sesso genetico. Anche se altre specie ittiche di piccola taglia possono essere adatte a un protocollo sperimentale analogo, i metodi specifici e gli endpoint di osservazione descritti in questo metodo di prova si applicano esclusivamente al medaka giapponese (cfr. il paragrafo 1). Il medaka si presta bene alla riproduzione in cattività; sono stati pubblicati metodi per la sua coltura (17) (18) (19) e sono disponibili dati di prove sulla letalità a breve termine, sui primi stadi di vita e sul ciclo vitale completo (5) (6) (8) (9) (20). Tutti i pesci sono soggetti a un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio. Essi sono nutriti con naupli di artemia vivi *Artemia* spp., integrati, se necessario, con mangime in fiocchi disponibile in commercio. Il mangime in fiocchi disponibile in commercio deve essere periodicamente analizzato per rilevare la presenza di eventuali contaminanti.

17. Purché siano seguite pratiche di allevamento adeguate, non è necessario un protocollo di coltura specifico. Ad esempio, i medaka possono essere allevati in vasche da 2 l con 240 larve per vasca fino a 4 settimane dopo la fecondazione e poi possono essere allevati in vasche da 2 l con 10 pesci per vasca fino a 8 settimane dopo la fecondazione; a questo punto le coppie riproduttrici sono trasferite in vasche da 2 l.

Acclimatazione e selezione dei pesci

18. I pesci da utilizzare nella prova vanno selezionati da un unico ceppo di laboratorio che sia stato acclimatato per almeno due settimane prima della sperimentazione in condizioni di qualità dell'acqua e di illuminazione simili a quelle usate durante la prova (NB: tale periodo di acclimatazione non è un periodo di pre-esposizione in situ). Si raccomanda che i pesci provengano dal laboratorio che esegue la prova, in quanto il trasporto è un fattore di stress per i pesci adulti e può interferire con una ovodeposizione affidabile. I pesci devono essere nutriti due volte al giorno con naupli di artemia, integrati da mangime in fiocchi disponibile in commercio, se necessario, per tutto il periodo del mantenimento e nella fase di esposizione. Per avviare questa prova si considera necessario un minimo di 42 coppie riproduttrici (54 coppie riproduttrici se è richiesto un controllo con solvente a causa, in parte, della mancanza di dati storici a sostegno dell'uso del solo controllo senza solvente) al fine di garantire una replica adeguata. Per ogni coppia riproduttrice di F0 si deve inoltre verificare che si tratti di una coppia XX-XY (ossia che presenti la configurazione normale di cromosomi sessuali per ogni sesso) per evitare la possibile inclusione di maschi spontanei XX (cfr. il paragrafo 39).

19. Nella fase di acclimatazione la mortalità nella coltura di pesci deve essere registrata e i seguenti criteri sono applicati al termine di un periodo di adattamento di 48 ore:

— mortalità superiore al 10 % della popolazione in coltura nei sette giorni che precedono il trasferimento al sistema di prova: respingere l'intero lotto;

— mortalità compresa fra il 5 % e il 10 % della popolazione nei sette giorni che precedono il trasferimento al sistema di prova: sette giorni supplementari di acclimatazione da aggiungere al periodo di acclimatazione di due settimane; se nel corso della seconda settimana la mortalità supera il 5 %, respingere l'intero lotto;

— mortalità inferiore al 5 % della popolazione nei sette giorni che precedono il trasferimento al sistema di prova: accettare il lotto.

20. I pesci non devono essere sottoposti a trattamenti per patologie durante il periodo di acclimatazione di due settimane che precede la prova e durante il periodo di esposizione e il trattamento di patologie deve essere evitato completamente, se possibile. I pesci che mostrano segni clinici di patologie non possono essere utilizzati nello studio. È necessario registrare le osservazioni e gli eventuali trattamenti profilattici e terapeutici durante il periodo di coltura che precede la prova.

21. La fase di esposizione deve iniziare con pesci adulti sessualmente dimorfici e geneticamente sessuati, provenienti da una popolazione allevata in laboratorio di animali sessualmente maturi allevati a 25 ± 2 °C. I pesci devono essere identificati come riproduttori comprovati (ossia che hanno prodotto una progenie vitale) nella settimana che precede l'esposizione. All'inizio della prova l'intervallo di peso in funzione del sesso dell'intero gruppo di pesci utilizzato per la prova deve essere mantenuto entro un margine di ± 20 % della media aritmetica del peso per lo stesso sesso. Occorre pesare un sottocampione di pesci prima della prova per stimare il peso medio. I pesci selezionati devono avere un'età di almeno 12 settimane dopo la fecondazione e avere un peso di ≥ 300 mg per le femmine e di ≥ 250 mg per i maschi.

DISEGNO SPERIMENTALE

Concentrazioni di prova

22. Si raccomanda di utilizzare cinque concentrazioni della sostanza chimica in esame oltre al o ai controlli. Tutte le fonti di informazione devono essere considerate quando si seleziona la gamma delle concentrazioni di prova, compresi le relazioni quantitative struttura-attività (QSAR), i metodi *read-across* utilizzati con sostanze analoghe, i risultati di prove su pesci come i saggi di tossicità acuta (capitolo C.1 del presente allegato), il saggio di tossicità a breve termine sulla riproduzione di pesci (capitolo C.48 del presente allegato) e altri metodi di prova, ad es. i capitoli C.15, C.37, C.41, C.47 o C.49 del presente allegato (21) (22) (23) (24) (25) (26), se tali dati sono disponibili, o, se necessario, i risultati di un test di definizione dell'intervallo delle concentrazioni (*range-finding test*) che comprenda eventualmente una fase di riproduzione. Se necessario, la prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni può essere effettuata in condizioni (qualità dell'acqua, sistema di prova, carico animale) analoghe a quelle della prova finale. Nel caso in cui sia necessario utilizzare un solvente e non si disponga di dati storici, la prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni può essere utilizzata per individuare l'adeguatezza del solvente. La concentrazione massima di prova non deve superare la solubilità dell'acqua, 10 mg/l o 1/10 della LC_{50} a 96 h (27). La concentrazione minima deve essere da 10 a 100 volte più bassa della concentrazione massima. L'uso di cinque concentrazioni in questa prova non solo consente di misurare le relazioni dose-risposta, ma fornisce anche la concentrazione minima a cui si osserva un effetto statisticamente significativo (LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*) e la concentrazione senza effetti osservabili (NOEC - *No Observed Effect Concentration*), che sono necessarie per una valutazione dei rischi in alcuni programmi di natura normativa o contesti giuridici. In genere, il fattore di distanza tra le concentrazioni nominali della sostanza chimica in esame tra livelli di trattamento adiacenti è ≤ 3,2.

Repliche nei gruppi trattati e di controllo

23. Occorre utilizzare un minimo di sei vasche di prova repliche per concentrazione di prova (cfr. l'appendice 7). Nella fase riproduttiva (tranne che per la generazione F0) la struttura di replica è raddoppiata per la valutazione della fecondità e ogni replica comporta un'unica coppia riproduttrice (cfr. il paragrafo 42).

24. Un controllo con l'acqua di diluizione e, se necessario, un controllo con solvente devono essere inclusi nella prova in aggiunta alle concentrazioni della sostanza chimica in esame. Un numero doppio di vasche di replica deve essere utilizzato per i controlli al fine di garantire una potenza statistica sufficiente (ossia dovranno essere utilizzate almeno dodici repliche per i controlli). Nella fase riproduttiva il numero di repliche nei controlli è raddoppiato (ossia un minimo di 24 repliche e ogni replica comporta un'unica coppia riproduttrice). Dopo la riproduzione le repliche di controllo non devono contenere più di 20 embrioni (pesci).

PROCEDURA

Inizio della prova

25. I pesci adulti riproduttori utilizzati per dare inizio alla generazione F0 della prova sono selezionati sulla base di due criteri: età (generalmente più di 12 settimane dopo la fecondazione ma preferibilmente non più di 16) e peso (deve essere ≥ 300 mg per le femmine e ≥ 250 mg per i maschi).

26. Le coppie maschio-femmina che rispondono ai criteri di cui sopra sono trasferite singolarmente in ciascuna vasca di replica, ossia dodici repliche per i controlli e sei repliche per i gruppi sottoposti a trattamento con la sostanza chimica in esame all'inizio della prova. Le vasche sono casualmente assegnate a un trattamento (ad es., T1-T5 e controllo) e a una replica (ad es., A-L controlli e A-F trattati) e sono quindi poste nel sistema di esposizione con un flusso appropriato per ogni vasca.

Condizioni di esposizione

27. Nell'appendice 3 figura una sintesi completa dei parametri e delle condizioni della prova. Il rispetto di tali specifiche dovrebbe portare a pesci di controllo con valori di endpoint simili a quelli elencati nell'appendice 4.

28. Durante la prova l'ossigeno disciolto, il pH e la temperatura devono essere misurati in almeno una vasca di prova per ciascun gruppo trattato e il controllo. Queste misurazioni, salvo la temperatura, devono essere effettuate come minimo una volta alla settimana per tutto il periodo di esposizione. La temperatura media dell'acqua per tutta la durata della prova deve essere compresa fra 24 e 26 °C. La temperatura deve essere misurata ogni giorno per tutto il periodo di esposizione. Il pH dell'acqua deve essere compreso entro 6,5 e 8,5, ma nel corso della medesima prova deve essere compreso entro un intervallo di ± 0,5 unità di pH. Le repliche all'interno di un trattamento non devono essere statisticamente diverse le une dalle altre e i gruppi trattati nell'ambito della prova non devono essere statisticamente diversi gli uni dagli altri (sulla base di una misurazione quotidiana delle temperature ed esclusi scarti di breve durata).

Durata dell'esposizione

29. La prova espone pesci della F0 sessualmente atti alla riproduzione per tre settimane. Nella settimana 4, all'incirca al 24 ° giorno della prova, la F1 è costituita e le coppie riproduttrici della F0 sono soppresse con metodi non cruenti e il loro peso e lunghezza sono registrati (cfr. il paragrafo 34). La generazione F1 è in seguito esposta per altre 14 settimane (totale di 15 settimane per F1) e la generazione F2 è esposta per due settimane fino alla schiusa. La durata totale della prova è in linea di massima di 19 settimane (ossia fino alla schiusa di F2). La cronologia della prova è indicata nella tabella 2 e spiegata in dettaglio nell'appendice 9.

Regime alimentare

30. I pesci possono essere alimentati *ad libitum* con naupli di artemia di 24 ore (*Artemia* spp.), integrati, se necessario, da mangime in fiocchi disponibile in commercio. Il mangime in fiocchi disponibile in commercio deve essere periodicamente analizzato per individuare l'eventuale presenza di contaminanti quali pesticidi organoclorurati, idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e policlorobifenili (PCB). Vanno evitati alimenti con un livello elevato di sostanze attive a livello endocrino (ossia fitoestrogeni) in quanto potrebbero pregiudicare la risposta della prova. II cibo avanzato e il materiale fecale vanno rimossi dalle vasche secondo la necessità, ad esempio pulendo con cura il fondo di ciascuna vasca con un sifone. Inoltre i lati e il fondo di ogni vasca devono essere puliti una o due volte alla settimana (ad esempio raschiando con una spatola). Nell'appendice 5 figura un esempio di programma di alimentazione. La frequenza di alimentazione si basa sul numero di pesci per replica. Essa è pertanto ridotta se si verificano casi di mortalità in una replica.

Misurazioni e determinazioni analitiche

31. Prima che inizi il periodo di esposizione va verificato il buon funzionamento del sistema di distribuzione della sostanza chimica in esame. Vanno stabiliti tutti i metodi analitici necessari, comprese sufficienti conoscenze sulla stabilità della sostanza chimica in esame nel sistema di prova. Durante la prova le concentrazioni della sostanza chimica in esame sono determinate a intervalli idonei, preferibilmente almeno una volta alla settimana in una replica per ogni gruppo trattato, con rotazione settimanale fra le repliche dello stesso gruppo trattato.

32. Durante la prova la portata del flusso del diluente e della soluzione madre devono essere verificate a intervalli regolari (ad es. almeno tre volte alla settimana). Si raccomanda che i risultati siano basati sulle concentrazioni misurate. Tuttavia, se la concentrazione della sostanza chimica in esame in soluzione è stata adeguatamente mantenuta nel corso dell'intera prova in un intervallo di ± 20 % dei valori medi misurati, i risultati possono essere calcolati a partire dai valori nominali o misurati. Nel caso di sostanze chimiche che si accumulano sensibilmente nei pesci, le concentrazioni di prova possono diminuire man mano che i pesci crescono. In tali casi si raccomanda di adattare il tasso di rinnovamento della soluzione di prova in ogni vasca al fine di mantenere le concentrazioni di prova il più costanti possibile.

Osservazioni e endpoint misurati

33. Gli endpoint misurati comprendono fecondità, fertilità, schiusa, crescita e sopravvivenza per valutare possibili effetti a livello di popolazione. Occorre inoltre osservare quotidianamente il comportamento e annotare eventuali comportamenti insoliti. Altri endpoint meccanicistici comprendono i livelli dell'mRNA della *vtg* epatica o proteina VTG mediante immunodosaggio (28), i marcatori sessuali fenotipici come le papille della pinna anale caratteristiche del maschio, la valutazione istologica del sesso gonadico e la valutazione istopatologica di reni, fegato e gonadi (cfr. elenco degli endpoint nella tabella 1). Tutti questi endpoint specifici sono valutati nel contesto della determinazione del sesso genetico dell'individuo, basata sulla presenza o assenza del gene *dmy* che determina il sesso maschile nel medaka (cfr. il paragrafo 41). Deve essere valutato anche il tempo di deposizione. Inoltre semplici rapporti numerici tra i sessi fenotipici possono essere stabiliti sulla base delle informazioni ricavate dal conteggio delle papille della pinna anale per definire singoli medaka come maschi o femmine fenotipici. Questo metodo di prova non è atto a individuare deviazioni modeste dal rapporto numerico tra i sessi atteso in quanto il numero relativamente scarso di pesci per replica non offre sufficiente potenza statistica. Inoltre nel corso della valutazione istopatologica è valutata la gonade e sono condotte analisi molto più potenti per valutare il fenotipo gonadico nel contesto del sesso genetico.

34. Scopo principale di questo metodo di prova è valutare gli effetti potenziali a livello di popolazione di una sostanza chimica in esame. Gli endpoint meccanicistici (VTG, CSS e taluni effetti istopatologici che interessano le gonadi) possono anche contribuire a determinare se esiste un effetto mediato da un'attività endocrina. Tali endpoint meccanicistici possono tuttavia essere influenzati anche da una tossicità sistemica o di altro tipo. Anche l'istopatologia epatica e renale può pertanto essere valutata in dettaglio per aiutare a meglio comprendere le eventuali risposte negli endpoint meccanicistici. Tuttavia, anche se queste valutazioni precise non sono effettuate, le anomalie macroscopiche osservate incidentalmente durante la valutazione istopatologica devono comunque essere annotate nella relazione sulla prova.

Soppressione incruenta dei pesci

35. Al termine dell'esposizione delle generazioni F0 e F1, e quando è prelevato un sottocampione di pesci subadulti, i pesci devono essere sottoposti a soppressione incruenta con quantità adeguate di soluzione anestetica (ad esempio metan sulfonato di tricaina, MS-222 (CAS.886-86-2), 100-500 mg/l) tamponata con 300 mg/l di $NaHCO_3$ (bicarbonato di sodio, CAS.144-55-8) per ridurre l'irritazione della mucosa. Se i pesci presentano segni di manifesta sofferenza (cioè elevatissime sofferenze e probabile morte) o sono moribondi, gli animali devono essere anestetizzati e soppressi con metodi non cruenti e trattati come casi di mortalità ai fini dell'analisi dei dati. Se un pesce viene soppresso per morbilità, ciò viene annotato nella relazione sulla prova. A seconda del momento durante la prova in cui il pesce è soppresso, l'animale può essere conservato per l'analisi istopatologica (mantenendolo in fissativo per un'eventuale esame istopatologico).

Manipolazione delle uova e delle larve

Raccolta delle uova delle coppie riproduttrici a fini di riproduzione della generazione successiva

36. Le uova sono raccolte il primo giorno (o i primi due giorni, se necessario) della settimana di prova 4 da F0 a F1 e della settimana di prova 18 da F1 a F2. La settimana di prova 18 corrisponde a pesci adulti F1 di età pari a 15 settimane dopo la fecondazione. È importante che tutte le uova siano rimosse da ogni vasca il giorno prima dell'inizio della raccolta per essere certi che tutte le uova raccolte da una coppia riproduttrice provengano dalla stessa deposizione. Dopo la deposizione le femmine di medaka talvolta trasportano le loro uova vicino alla cloaca in attesa di poterle deporre su un substrato. In assenza di un substrato nella vasca, le uova si trovano attaccate alla femmina o sul fondo della vasca. In funzione della loro localizzazione, le uova sono prelevate con precauzione dalla femmina o sifonate dal fondo della vasca nella settimana di prova 4 di F0 e nella settimana di prova 18 di F1. Tutte le uova raccolte nell'ambito di un trattamento sono riunite prima di essere distribuite negli incubatori.

37. I filamenti che tengono insieme le uova deposte devono essere rimossi. Le uova fecondate (fino a 20) sono raccolte da ciascuna coppia riproduttrice (1 coppia per replica), raggruppate per trattamento e distribuite in modo sistematico negli incubatori appropriati (appendici 6 e 7). Utilizzando un microscopio a dissezione di buona qualità si possono osservare i segni distintivi dell'inizio della fecondazione/dello sviluppo quali il rigonfiamento della membrana di fecondazione (corio), la divisione cellulare in corso o la formazione della blastula. Gli incubatori possono essere posti in "acquari incubatori" distinti per ogni trattamento (nel qual caso vanno misurati i parametri di qualità dell'acqua e le concentrazioni della sostanza chimica in esame) o nella vasca delle repliche che conterrà le larve schiuse (ad esempio eleuteroembrioni). Se è necessario un secondo giorno di raccolta (23 ° giorno di prova), tutte le uova di entrambi i giorni devono essere riunite e distribuite sistematicamente tra le repliche di trattamento.

Allevamento delle uova fino alla schiusa

38. Le uova fecondate sono agitate costantemente, ad esempio mediante bolle d'aria nell'incubatore o agitando verticalmente l'incubatore. La mortalità delle uova fecondate (embrioni) è controllata e registrata quotidianamente. Le uova morte sono eliminate dagli incubatori (appendice 9). Il 7 ° giorno successivo alla fecondazione l'agitazione cessa o è ridotta in modo che le uova fecondate si depositino sul fondo dell'incubatore. Questo favorisce la schiusa, che avviene generalmente entro uno o due giorni. Per ciascun trattamento e controllo si contano le larve (giovani larve, eleuteroembrioni) (raggruppando le repliche). Le uova fecondate che non si sono schiuse entro il doppio del giorno mediano di schiusa nel controllo (generalmente tra 16 e 18 giorni dopo la fecondazione) sono considerate non vitali e scartate.

39. Dodici larve sono trasferite in ogni vasca di replica. Le larve provenienti dagli incubatori sono raggruppate e distribuite in modo sistematico nelle vasche di replica (appendice 7). A tal fine si può selezionare casualmente una larva dall'insieme delle larve trattate e aggiungere in modo sequenziale una larva estratta a sorte in una vasca per repliche. Ogni vasca deve contenere lo stesso numero (n=12) di larve schiuse (massimo 20 larve per vasca). Se non vi sono larve a sufficienza per riempire tutte le repliche di trattamento si raccomanda di fare in modo che quante più repliche possibili dispongano di 12 larve. Le larve possono essere manipolate in sicurezza con pipette in vetro di diametro ampio. Le larve in sovrannumero sono soppresse in modo non cruento con un anestetico. Nelle settimane che precedono la formazione delle coppie riproduttrici il giorno in cui è osservata la prima deposizione per ogni replica deve essere registrato.

Formazione delle coppie riproduttrici

Prelievo tissutale a livello della pinna e determinazione del sesso genotipico

40. La determinazione del sesso genotipico mediante prelievo tissutale a livello della pinna è effettuata a 9-10 settimane dopo la fecondazione (ossia nella settimana di prova 12-13 per la generazione F1). Tutti i pesci di una vasca sono anestetizzati (utilizzando metodi approvati, ad esempio IACUC) e un piccolo campione di tessuto è prelevato all'estremità dorsale o ventrale della pinna caudale di ogni pesce per determinare il sesso genotipico dell'individuo (29). I pesci di una replica possono essere posti in piccole gabbie, possibilmente uno per gabbia, nella vasca di replica. In alternativa è possibile alloggiare due pesci in ogni gabbia se si possono distinguere uno dall'altro. A tale scopo si può tagliare in modo diverso la pinna caudale al momento del prelievo tissutale (ad esempio praticare un taglio all'estremità dorsale e l'altro all'estremità ventrale).

41. Il sesso genotipico del medaka è determinato da un gene identificato e sequenziato (*dmy*) situato sul cromosoma Y. La presenza di *dmy* indica che si tratta di un individuo XY indipendentemente dal fenotipo, mentre l'assenza di *dmy* indica che si tratta di un individuo XX indipendentemente dal fenotipo (30) (31). L'acido deossiribonucleico (DNA) è estratto da ciascun tessuto prelevato e la presenza o l'assenza di *dmy* è determinata mediante il metodo della reazione a catena della polimerasi (PCR) (si veda l'appendice 9 nel capitolo C.41 del presente allegato o le appendici 3 e 4 in (29).

Formazione delle coppie riproduttrici

42. Le informazioni sul sesso genotipico sono utilizzate per formare le coppie riproduttrici XX-XY a prescindere dal fenotipo esterno, che può essere modificato dall'esposizione alla sostanza chimica in esame. Il giorno successivo alla determinazione del sesso genotipico di ciascun pesce due pesci XX e due pesci XY da ogni replica sono selezionati in modo casuale e due coppie riproduttrici XX-XY sono formate. Se una replica non dispone di due pesci XX o due pesci XY, occorre procurarsi pesci adeguati da altre repliche nell'ambito del trattamento. La priorità è disporre del numero raccomandato di repliche di coppie riproduttrici (12) in ogni trattamento e nei controlli (24). I pesci che presentano anomalie apparenti (problemi di vescica natatoria, deformazioni spinali, dimensioni estreme, ecc.) sono da scartare al momento della formazione delle coppie riproduttrici. Nella fase riproduttiva di F1 ogni vasca di replica deve contenere una sola coppia riproduttrice.

Campionamento di subadulti e valutazione degli endpoint

Campionamento di coppie non riproduttrici

43. Dopo la formazione delle coppie riproduttrici i pesci non selezionati per la riproduzione sono soppressi con metodi non cruenti per misurare gli endpoint subadulti nella settimana di prova 12-13 (F1). È estremamente importante manipolare i pesci in modo che il sesso genotipico determinato per la selezione delle coppie riproduttrici possa ancora essere tracciato per ogni singolo pesce. Tutti i dati raccolti sono analizzati nel contesto del sesso genotipico di un individuo specifico. Ogni pesce è utilizzato per misurare una serie di endpoint, fra cui: la determinazione dei tassi

di sopravvivenza dei pesci giovani/pesci subadulti (settimane di prova 7-12/13) (F1), la crescita in lunghezza (è possibile misurare la lunghezza standard se la pinna caudale è stata accorciata a seguito del campionamento per la determinazione del sesso genetico). La lunghezza totale può essere misurata solo se è stata prelevata una porzione, dorsale o ventrale, della pinna caudale, per *dmy*) e la massa corporea (ossia il peso umido, secco), l'mRNA della *vtg* epatica (o della VTG) e le papille della pinna anale (cfr. le tabelle 1 e 2). Va notato che sono necessari anche i pesi e le lunghezze delle coppie riproduttrici per calcolare la crescita media in un gruppo trattato.

Prelievo tissutale e misurazione della vitellogenina

44. Il fegato è dissezionato e deve essere conservato a ≤ -70 °C fino alla misurazione dell'mRNA della *vtg* (o della VTG). La coda del pesce, inclusa la pinna anale, è conservata in un fissativo appropriato (ad esempio di Davidson) o fotografata in modo che sia possibile contare le papille della pinna anale in un momento successivo. Se lo si desidera, in questa fase possono essere prelevati e conservati altri tessuti (ad esempio, gonadi). La concentrazione della VTG epatica deve essere quantificata mediante una tecnica ELISA omologa (cfr. le procedure raccomandate per il medaka nell'appendice 6 del capitolo C.48 del presente allegato). Per quantificare l'mRNA della *vtg* si possono utilizzare metodi alternativi, messi a punto dall'U.S EPA (29), consistenti nell'estrazione dell'mRNA del gene *vtg I* di un campione epatico e nella quantificazione del numero di copie del gene *vtg I* (per ng dell'mRNA totale) mediante PCR quantitativa. Invece di determinare il numero di copie del gene *vtg* nei gruppi di controllo e nei gruppi trattati, un metodo meno dispendioso dal punto di vista delle risorse e meno difficile dal punto di vista tecnico consiste nel determinare il cambiamento relativo (fattore moltiplicatore) nell'espressione del gene *vtg I* nei gruppi di controllo e nei gruppi trattati.

Caratteri sessuali secondari

45. In circostanze normali solo i medaka maschi sessualmente maturi presentano delle papille, che si sviluppano sui segmenti congiunti di alcuni raggi della pinna anale e costituiscono un carattere sessuale secondario che può servire da biomarcatore per gli effetti nocivi sul sistema endocrino. Il metodo per contare le papille della pinna anale (numero di segmenti congiunti con papille) è indicato nell'appendice 8. Il numero di papille della pinna anale per individuo è utilizzato anche per classificare gli individui come fenotipo esterno maschile o femminile ai fini del calcolo di un semplice rapporto numerico tra i sessi per ogni replica. Un medaka con un numero di papille superiore a 0 è definito come maschio; un medaka con 0 papille è definito come femmina.

Valutazione della fecondità e della fertilità

46. La fecondità e la fertilità sono valutate nelle settimane di prova da 1 a 3 nella generazione F0 e nelle settimane di prova da 15 a 17 nella generazione F1. Le uova sono raccolte quotidianamente da ogni coppia riproduttrice per 21 giorni consecutivi. Sono rimosse delicatamente dalle femmine (poste in un retino) e/o sifonate dal fondo della vasca tutte le mattine. Fecondità e fertilità sono registrate ogni giorno per ciascuna coppia riproduttrice replica. La fecondità è definita come il numero di uova deposte e la fertilità è definita funzionalmente come il numero di uova fecondate e vitali al momento del conteggio. Il conteggio deve essere effettuato il prima possibile dopo la raccolta delle uova.

47. La fecondità delle repliche è registrata quotidianamente ed è intesa come il numero di uova per coppia riproduttrice analizzato mediante le procedure statistiche raccomandate utilizzando le medie delle repliche. La fertilità delle repliche è data dalla somma del numero di uova fertili prodotte da una coppia riproduttrice divisa per la somma del numero di uova prodotte da tale coppia. Statisticamente la fertilità è analizzata come un rapporto per replica. Il tasso di schiusa delle repliche è dato dal numero di larve diviso per il numero di embrioni caricati (generalmente 20). Statisticamente il tasso di schiusa è analizzato come un rapporto per replica.

Campionamento di adulti e valutazione degli endpoint

Campionamento di coppie riproduttrici

48. Dopo la settimana di prova 17 (ossia dopo che la generazione F2 è stata avviata con successo) gli adulti F1 sono soppressi con metodi non cruenti e vari endpoint sono misurati (cfr. le tabelle 1 e 2). Si ottiene un'immagine della pinna anale e la si esamina per valutare le papille (cfr. l'appendice 8) e/o la coda è rimossa a livello immediatamente posteriore alla cloaca e fissata per un conteggio successivo delle papille. Se lo si desidera, in questa fase una parte della pinna caudale può essere prelevata e archiviata per la verifica del sesso genetico (*dmy*). Se necessario, può essere prelevato un campione tissutale per ripetere l'analisi del *dmy* e verificare il sesso genetico di determinati pesci. Prima di immergere l'intero corpo nel fissativo si apre la cavità corporea per praticare una perfusione con fissativi appropriati (ad esempio di Davidson). Tuttavia se prima della fissazione è effettuata una procedura di permeabilizzazione adeguata, non è necessario aprire la cavità corporea.

Esame istopatologico

49. Tutti i pesci sono sottoposti a un esame istologico per patologie del tessuto gonadico (30); (29). Come indicato al paragrafo 33, altri endpoint meccanicistici valutati in questo metodo di prova (ossia VTG, CSS e taluni effetti istopatologici gonadici) possono essere influenzati da una tossicità sistemica o di altro tipo. Anche l'istopatologia epatica e renale può pertanto essere valutata in dettaglio per aiutare a meglio comprendere le eventuali risposte negli endpoint meccanicistici. Tuttavia, anche se queste valutazioni precise non sono effettuate, le anomalie macroscopiche osservate incidentalmente durante la valutazione istopatologica devono comunque essere annotate nella relazione sulla prova. Si può considerare una lettura "dall'alto verso il basso" dal gruppo più esposto (rispetto al controllo) fino al trattamento senza effetto; si raccomanda tuttavia di consultare il documento di orientamento di istopatologia (29). Generalmente tutti i campioni sono preparati/sezionati prima di essere esaminati dal patologo. Se si utilizza un approccio "dall'alto verso il basso" si nota che la procedura Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS) è fondata sull'aspettativa che con l'aumento dei livelli di dose aumenti anche l'impatto biologico (la patologia). Pertanto si perde potenza se si considera solo un'unica dose elevata senza dosi intermedie. Se non è necessaria un'analisi statistica per determinare che la dose elevata non ha effetto, questo approccio può essere accettabile. Anche il fenotipo gonadico è determinato da questa valutazione.

Altre osservazioni

50. La prova MEOGRT fornisce dati utilizzabili (ad esempio in un approccio basato sul peso delle prove) per valutare contemporaneamente almeno due tipi generali di meccanismi d'azione degli effetti avversi (AOP) che producono effetti a livello di riproduzione: a) meccanismi a mediazione endocrina che comportano una perturbazione dell'asse endocrino ipotalamo-ipofisi-gonadi (HPG); e b) meccanismi che provocano una riduzione della sopravvivenza, della crescita (lunghezza e peso) e della riproduzione a causa di una tossicità a mediazione non endocrina. Anche endpoint generalmente misurati in prove di tossicità cronica quali la prova sul ciclo vitale completo e la prova sui primi stadi di vita sono compresi nella presente prova e possono essere utilizzati per valutare i pericoli posti sia da meccanismi di azione tossici a mediazione non endocrina sia da meccanismi di tossicità a mediazione endocrina. Durante la prova occorre inoltre osservare quotidianamente i comportamenti e prendere nota di eventuali comportamenti insoliti. Inoltre si devono registrare i decessi e calcolare la sopravvivenza fino alla selezione dei pesci (settimana di prova 6/7), la sopravvivenza dopo la selezione fino al prelievo subadulto (9-10 settimane dopo la fecondazione) e la sopravvivenza dalla formazione delle coppie fino al campionamento dei pesci adulti.

Tabella 1

Panoramica degli endpoint del MEOGRT (*)

Fase di vita	Endpoint	Generazione
Embrioni (2 settimane dopo la fecondazione)	Schiusa (% e tempo di schiusa)	F1, F2
Pesci giovani (4 settimane dopo la fecondazione)	Sopravvivenza	F1
Subadulti (9 o 10 settimane dopo la fecondazione)	Sopravvivenza	F1
	Crescita (peso e lunghezza)	
	Vitellogenina (mRNA o proteina)	
	Caratteri sessuali secondari (papille della pinna anale)	
	Rapporto numerico tra i sessi a livello esterno	
	Termine fino alla prima deposizione	
Adulti (12-14 settimane dopo la fecondazione)	Riproduzione (fecondità e fertilità)	F0, F1
Adulti (15 settimane dopo la fecondazione)	Sopravvivenza	F1
	Crescita (peso e lunghezza)	
	Caratteri sessuali secondari (papille della pinna anale)	
	Esame istopatologico (gonadi, fegato, reni)	

(*) Questi endpoint devono essere oggetto di un'analisi statistica.

CRONOLOGIA

51. La tabella 2 illustra lo svolgimento cronologico della prova MEOGRT. Tale prova comprende 4 settimane di esposizione degli adulti F0, 15 settimane di esposizione della generazione F1 e un periodo di esposizione della seconda generazione (F2) fino alla schiusa (2 settimane dopo la fecondazione). L'appendice 9 riepiloga le diverse fasi dall'inizio alla fine della prova MEOGRT.

Tabella 2

MEOGRT - Cronologia dell'esposizione e della misurazione degli endpoint

F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																		1	2
Settimana di	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Stadio della vita					**Embrione**					**Larva**					**Pesci giovani**			**Subadulto**	**Adulto**
Endpoint																			
Fecondità	F_0														F_1				
Fertilità	F_0														F_1				
Schiusa					F_1														F_2
Sopravvivenza						F_1						F_1						F_1	
Crescita				F_0								F_1						F_1	
Vitellogenina												F_1							
Caratteri sessuali secondari												F_1						F_1	
Esame istopatologico																		F_1	
Settimana di prova	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- Disegno sperimentale: 7 gruppi di repliche
  - 5 trattati con la sostanza chimica in esame
  - 2 gruppi di controllo (4 se si usa un solvente)
- Disegno intragruppo
  - 12 repliche per la riproduzione, la patologia adulta e i CSS (sett. da 10 a 18)
  - 6 repliche per la schiusa, la sopravvivenza e la Vtg e CSS e crescita subadulti (sett. da 1 a 9)

CSS: caratteri sessuali secondari
sett.: settimane
Vtg: vitellogenina

DATI E RELAZIONI

Analisi statistica

52. Dato che il sesso genotipico è determinato per tutti i pesci oggetto della prova, i dati devono essere analizzati separatamente per ciascun sesso genotipico (ossia maschi XY e femmine XX). Il mancato rispetto di tale condizione ridurrebbe notevolmente la potenza statistica dell'analisi. È preferibile effettuare le analisi statistiche secondo le procedure descritte nel documento dell'OCSE intitolato *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (32). L'appendice 10 fornisce ulteriori orientamenti per l'analisi statistica.

53. Il disegno sperimentale e le prove statistiche prescelte devono avere una potenza tale da consentire di individuare i cambiamenti d'importanza biologica negli endpoint per i quali occorre determinare la NOEC (32). Le pertinenti concentrazioni con effetto e i parametri da riportare nella relazione possono dipendere dal quadro normativo. Occorre identificare per ciascun endpoint la variazione percentuale che è importante individuare o stimare. Il disegno sperimentale deve essere concepito in modo da permettere ciò. Poiché è improbabile che la stessa variazione percentuale si verifichi in tutti gli endpoint e che si possa concepire un esperimento realizzabile che soddisfi i suddetti criteri per tutti gli endpoint, è necessario che il disegno sperimentale si concentri sugli endpoint che sono importanti per l'esperimento. L'appendice 10 contiene un diagramma di analisi statistica e orientamenti per facilitare il trattamento dei dati e la scelta del test o del modello statistico più adatti. È possibile impiegare altri approcci statistici, purché siano scientificamente giustificati.

54. È necessario analizzare le variazioni all'interno di ogni serie di repliche effettuando un'analisi della varianza o avvalendosi di tabelle di contingenza e utilizzare metodi sufficienti e adeguati di analisi statistica fondati su questa analisi. Per effettuare un confronto multiplo fra i risultati ottenuti alle singole concentrazioni e quelli ottenuti per i controlli, si raccomanda un test di tendenza regressivo (test di Jonckheere-Terpstra) nel caso delle risposte continue. Se i dati non sono compatibili con una relazione concentrazione-risposta monotona, devono essere utilizzati il test di Dunnett o il test di Dunn (se necessario, dopo un'adeguata trasformazione dei dati).

55. Per la fecondità il conteggio delle uova deve aver luogo ogni giorno, ma può essere analizzato nella sua globalità o come una misura ripetuta. L'appendice 10 precisa come va analizzato questo endpoint. Per i dati istopatologici espressi sotto forma di indici di gravità è stato messo a punto un nuovo test statistico, il Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) (33).

56. È necessario annotare nella relazione sulla prova qualsiasi endpoint osservato nei gruppi trattati con la sostanza chimica che presenti differenze significative rispetto a controlli adeguati.

Considerazioni relative all'analisi dei dati

Utilizzazione di livelli di esposizione compromessi

57. Diversi fattori vanno considerati al fine di stabilire se una replica o un intero trattamento presentano segni di tossicità evidente e devono pertanto essere esclusi dall'analisi. Si considera che esiste tossicità evidente in una replica fra 3 e 9 settimane dopo la fecondazione in presenza di una mortalità imputabile unicamente alla tossicità - e non ad errore tecnico - superiore a 4 individui. Altri sintomi di tossicità evidente comprendono emorragia, comportamenti anomali, movimenti natatori anomali, inappetenza, nonché qualunque altro segno clinico di malattia. Per individuare i segnali di tossicità subletale si rende a volte necessario ricorrere a valutazioni qualitative, sempre eseguite rispetto al gruppo di controllo con acqua di diluizione (solo acqua pulita). Se una tossicità evidente si manifesta nel o nei trattamenti con la dose più elevata, si raccomanda di escludere dall'analisi tali trattamenti.

Gruppi di controllo con solvente

58. Il ricorso al solvente deve essere preso in considerazione soltanto come ultima istanza, dopo aver valutato tutte le altre opzioni di somministrazione della sostanza chimica. Se si utilizza un solvente, è necessario eseguire un controllo con acqua di diluizione in parallelo. Al completamento della prova, vanno valutati i potenziali effetti del solvente mediante un confronto statistico tra il gruppo di controllo con solvente e il gruppo di controllo con acqua di diluizione. I principali parametri da considerare in questo contesto sono gli indicatori di crescita (peso), poiché essi sono sensibili alla tossicità generale. Se tra il gruppo di controllo con acqua di diluizione e il gruppo di controllo con solvente vengono rilevate differenze statisticamente significative, si deve ricorrere al giudizio professionale di un esperto per stabilire se la validità della prova è compromessa. Se i due controlli presentano differenze, i gruppi esposti alla sostanza chimica devono essere confrontati con il controllo con solvente, a meno che non sia noto che è preferibile effettuare il confronto con il controllo con acqua di diluizione. Se non vi sono differenze statisticamente significative tra i due gruppi di controllo, si raccomanda di confrontare i gruppi esposti alla sostanza chimica in esame con i due gruppi di controllo (solvente e acqua di diluizione) riuniti insieme, a meno che non sia noto che è preferibile effettuare il confronto con il solo gruppo di controllo con acqua di diluizione o con il solo gruppo di controllo con solvente.

Relazione sulla prova

59. I seguenti dati devono figurare nella relazione sulla prova:

Sostanza chimica in esame natura fisica e, se del caso, proprietà fisico-chimiche;

— dati di identificazione chimica;

Sostanza monocostituente:

— aspetto fisico, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche;

— identificazione chimica, come la denominazione IUPAC o CAS, il numero CAS, il codice SMILES o InChI, la formula strutturale, la purezza, l'identità chimica delle impurezze, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc. (incluso il tenore di carbonio organico, se opportuno).

Sostanza multicostituente, UVCB e miscele:

— caratterizzate nella massima misura possibile con l'identità chimica (cfr. sopra), con la presenza quantitativa e con le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti.

Specie sperimentale:

— nome scientifico, ceppo, se disponibile, origine e metodo di raccolta delle uova fecondate e successiva manipolazione.

Condizioni sperimentali:

— fotoperiodo/i;

— disegno sperimentale (ad esempio, dimensioni della vasca, materiale e volume d'acqua, numero di vasche di prova e repliche, numero di larve per replica);

— metodo di preparazione delle soluzioni madre e frequenza di rinnovo (indicare l'agente solubilizzante, se usato, e la sua concentrazione);

— metodo di dosaggio della sostanza chimica in esame (ad esempio pompe dosatrici, sistemi di diluizione);

— efficienza di recupero del metodo e concentrazioni nominali di prova, limite di quantificazione, medie dei valori misurati e rispettive deviazioni standard nelle vasche di prova, metodo con cui tali deviazioni e medie sono state ottenute così come dati comprovanti che le misurazioni corrispondono alle concentrazioni della sostanza chimica in esame in soluzione vera;

— caratteristiche dell'acqua di diluizione: pH, durezza, temperatura, concentrazione dell'ossigeno disciolto, livelli di cloro residuo (se misurati), carbonio organico totale (idem), solidi in sospensione (idem), salinità del mezzo di prova (idem) e altre eventuali misurazioni eseguite;

— concentrazioni nominali di prova, medie dei valori misurati e loro deviazioni standard;

— qualità dell'acqua nelle vasche sperimentali: pH, temperatura (giornaliera) e concentrazione di ossigeno disciolto;

— informazioni dettagliate sull'alimentazione (ad esempio tipo di cibo, origine, quantità somministrata e frequenza).

Risultati

— Dati comprovanti il fatto che i controlli hanno soddisfatto i criteri di validazione generali;

— dati relativi al gruppo di controllo (più controllo con solvente se del caso) e ai gruppi trattati: schiusa (tasso di schiusa e tempo di schiusa) per F1 e F2, sopravvivenza dopo la schiusa per F1, crescita (lunghezza e peso corporeo) per F1, sesso genotipico e differenziazione sessuale (ad esempio caratteri sessuali secondari basati sulle papille della pinna anale e istologia gonadica) per F1, sesso fenotipico per F1, caratteri sessuali secondari (papille della pinna anale) per F1, mRNA della *vtg* (o proteina VTG) per F1, esame istopatologico (gonadi, fegato e reni) per F1 e riproduzione (fecondità e fertilità) per F0, F1; (cfr. le tabelle 1 e 2);

— approccio seguito per l'analisi statistica (analisi di regressione o analisi della varianza) e per il trattamento dei dati (test e modelli statistici utilizzati);

— concentrazione senza effetti osservati (NOEC) per ogni risposta valutata;

— concentrazione minima alla quale si osserva un effetto (LOEC) per ogni risposta valutata (p = 0,05); EC_x per ogni risposta studiata, se del caso, e intervalli di confidenza (ad esempio 90 % o 95 %), grafico del modello adattato utilizzato per calcolarla, pendenza della curva concentrazione-risposta, formula del modello di regressione, stima dei parametri del modello e dei rispettivi errori tipo;

— eventuali deviazioni dal metodo di prova e dai criteri di accettazione e considerazioni relative alle potenziali conseguenze sui risultati della prova.

60. Per i risultati delle misurazioni degli endpoint vanno presentati i valori medi e le rispettive deviazioni standard (se possibile, per replica e per concentrazione).

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. Current Protocols in Toxicology 39: 1-36.

(3) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. Water Research 16: 457–464.

(5) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 19: 1925-1930.

(6) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2552-2560.

(7) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17β-Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Chemosphere 47: 71–80.

(8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 21: 1692-1698.

(9) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-T*ert*-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 22: 1487-1496.

(10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. Aquatic Toxicology 79: 288-295.

(11) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. Aquatic Toxicology 77: 78-86.

(12) Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Journal of Applied Toxicology 35:11-23.

(13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Available at: http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html.

(14) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. Chemosphere 86: 593-599.

(15) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

(17) Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.

(18) Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). Biology of Reproduction 61: 1287-1293.

(19) Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.

(20) Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety 54: 330-338.

(21) Capitolo C.15 del presente allegato, Pesci, prova di tossicità a breve termine sugli stadi di embrione e di larve con sacco vitellino.

(22) Capitolo C.37 del presente allegato, Prova sui pesci di 21 giorni: Screening a breve termine dell'attività estrogenica e androgenica e dell'inibizione dell'aromatasi.

(23) Capitolo C.41 del presente allegato, Prova sullo sviluppo sessuale dei pesci.

(24) Capitolo C.48 del presente allegato, Saggio di tossicità a breve termine sulla riproduzione di pesci.

(25) Capitolo C.47 del presente allegato, Prova di tossicità sui pesci nei primi stadi di vita.

(26) Capitolo C.49 del presente allegato, Prova di tossicità acuta sugli embrioni di pesci.

(27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. Chemosphere 92: 1067-1076.

(28) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301-308.

(29) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Schartl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. Genetics 163: 245–251.

(31) Shinomiya, A, Otake H. Togashi K. Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, Zoological Science 21: 613-619.

(32) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(33) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1108-1116.

Appendice 1

DEFINIZIONI

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*): prova di immunoassorbimento enzimatico.

Fecondità = numero di uova.

Fertilità = numero di uova vitali/fecondità.

Lunghezza alla forca (FL): lunghezza dall'apice del muso all'estremità dei raggi centrali della pinna caudale; è utilizzata per i pesci in cui è difficile determinare la fine della colonna vertebrale (www.fishbase.org).

Tasso di schiusa = larve/numero di embrioni caricati in un incubatore.

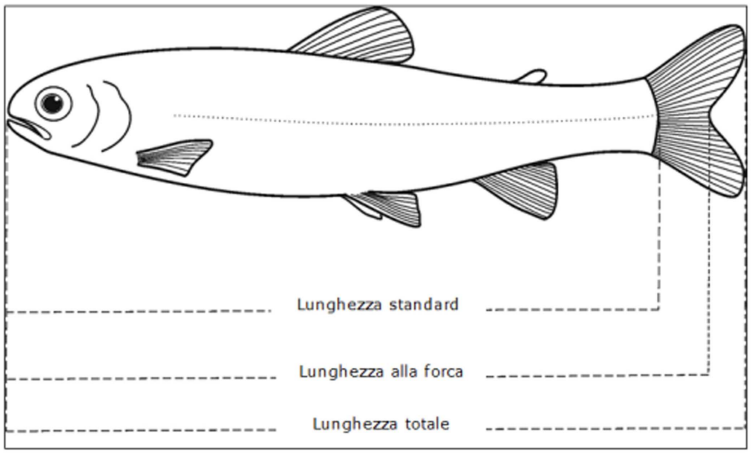
IACUC (*Institutional Animal Care and Use Committee*): Comitato istituzionale per la cura e l'utilizzo degli animali.

Lunghezza standard (SL): lunghezza del pesce misurata tra l'apice del muso e l'estremità posteriore dell'ultima vertebra o l'estremità posteriore della parte laterale media della piastra ipurale. In altre parole, questa misurazione non tiene conto della lunghezza della pinna caudale. (www.fishbase.org).

Lunghezza totale (TL): lunghezza dall'apice del muso all'estremità del lobo più lungo della pinna caudale, generalmente misurata con i lobi appiattiti nel prolungamento della linea mediana. La misurazione si effettua in linea retta, senza seguire la curva del corpo (www.fishbase.org).

Figura 1

Descrizione delle varie lunghezze utilizzate



EC_x: (concentrazione con effetto dell'x %): la concentrazione che provoca un effetto nell'x % degli organismi di prova durante un determinato periodo di esposizione rispetto al controllo. Ad esempio, EC_{50} è la concentrazione che si ritiene produca un effetto su un endpoint in esame nel 50 % della popolazione esposta durante il periodo di esposizione definito.

Prova a flusso continuo: prova nella quale le soluzioni testate scorrono nel sistema sperimentale con un flusso continuo durante il periodo di esposizione.

HPG (*Hypothalamic-pituitary-gonadal*) Axis: asse ipotalamo-ipofisi-gonadi.

IUPAC *(International Union of Pure and Applied Chemistry)*: Unione internazionale di chimica pura e applicata.

Tasso di carico: peso a umido dei pesci per volume di acqua.

Concentrazione minima alla quale si osserva un effetto (LOEC — *Lowest Observed Effect Concentration*): concentrazione più bassa testata della sostanza chimica in esame alla quale si osserva un effetto significativo ($p < 0,05$) rispetto al controllo. Tutte le concentrazioni di prova superiori alla LOEC, tuttavia, devono avere un effetto dannoso uguale o superiore a quello osservato per la LOEC. Quando queste due condizioni non possono essere soddisfatte, occorre fornire una spiegazione dettagliata per spiegare come è stata scelta la LOEC (e di conseguenza la NOEC). Le appendici 5 e 6 forniscono orientamenti al riguardo.

Concentrazione letale mediana (LC_{50}): concentrazione della sostanza chimica in esame ritenuta letale per il 50 % degli organismi esposti nell'arco temporale della prova.

Concentrazione senza effetti osservati (NOEC): concentrazione di prova immediatamente inferiore alla LOEC, alla quale non vengono osservati effetti statisticamente significativi ($p < 0,05$) rispetto al controllo durante il periodo di esposizione definito.

SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*): notazione semplificata lineare delle molecole.

Densità della popolazione: numero di pesci per volume di acqua.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata applicando il presente metodo di prova.

UVCB: sostanze la cui composizione non è conosciuta o è variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali origine biologica.

VTG: la vitellogenina è una lipo-glico-fosfo-proteina precursore delle proteine del tuorlo normalmente prodotta dalle femmine sessualmente attive di tutte le specie ovipare.

SDF: settimane dopo la fecondazione.

Appendice 2

ALCUNE CARATTERISTICHE CHIMICHE DI UN'ACQUA DI DILUIZIONE DI QUALITÀ ACCETTABILE

Sostanza	Concentrazione limite
Particolato	5 mg/l
Carbonio organico totale	2 mg/l
Ammoniaca non ionizzata	1 µg/l
Cloro residuo	10 µg/l
Pesticidi organofosforati totali	50 ng/l
Pesticidi organoclorurati totali più difenili policlorurati	50 ng/l
Cloro organico totale	25 ng/l
Alluminio	1 µg/l
Arsenico	1 µg/l
Cromo	1 µg/l
Cobalto	1 µg/l
Rame	1 µg/l
Ferro	1 µg/l
Piombo	1 µg/l
Nichel	1 µg/l
Zinco	1 µg/l
Cadmio	100 ng/l
Mercurio	100 ng/l
Argento	100 ng/l

Appendice 3

CONDIZIONI SPERIMENTALI PER IL MEOGRT

1. Specie raccomandata	Medaka giapponese (*Oryzias latipes*)
2. Tipo di prova	Flusso continuo
3. Temperatura dell'acqua	La temperatura nominale della prova è di 25 °C. La temperatura media in ogni vasca per tutta la durata della prova è di 24-26 °C.
4. Qualità dell'illuminazione	Lampade fluorescenti (ad ampio spettro e ~150 lumen/m^2) (~150 lux).
5. Fotoperiodo	16 ore di luce, 8 ore di buio
6. Percentuale di caricamento	F0: 2 adulti/replica; F1: avvio con un massimo di 20 uova (embrioni)/replica, ridotti a 12 embrioni/replica alla schiusa poi 2 adulti (copia riproduttrice XX-XY) a 9-10 sdf per la fase di riproduzione
7. Volume utilizzabile minimo per vasca di prova	1,8 l (ad es., dimensioni di una vasca: 18x9x15 cm)
8. Rinnovo delle soluzioni di prova, in volume	Minimo di 5 rinnovi in volume/giorno fino a 16 rinnovi in volume/giorno (o flusso di 20 ml/min)
9. Età degli organismi sperimentali all'avvio della prova	F0: > 12 sdf preferibilmente senza superare 16 sdf
10. Numero di organismi per replica	F0: 2 pesci (coppia maschio e femmina); F1: massimo 20 pesci (uova)/replica (prodotti dalle coppie riproduttrici F0 e F1).
11. Numero di trattamenti	5 trattamenti per la sostanza chimica in esame più controlli appropriati
12. Numero di repliche per trattamento	Minimo 6 repliche per trattamento per la sostanza chimica in esame e minimo 12 repliche per il controllo, e per il controllo con solvente se utilizzato (il numero di repliche è raddoppiato durante la fase di riproduzione a F1)
13. Numero di organismi per prova	Minimo 84 pesci in F0 e 504 in F1. (in caso di controlli con solvente 108 pesci in F0 e 648 pesci in F1). L'unità di conteggio è il post-eleuteroembrione.
14. Regime alimentare	I pesci sono alimentati *ad libitum* con naupli di artemia di 24 ore (*Artemia* spp.), integrati, se necessario, da mangime in fiocchi disponibile in commercio (nell'appendice 5 figura un esempio di programma di alimentazione per garantire una crescita e uno sviluppo adeguati per una riproduzione sostenuta).
15. Aerazione	Nessuna, salvo se l'ossigeno disciolto è < 60 % del valore di saturazione dell'aria.
16. Acqua di diluizione	Acqua di superficie, acqua di pozzo o ricostituita o acqua di rubinetto non clorata, pulita.

17. Periodo d'esposizione	In linea di massima 19 settimane (da F0 alla schiusa di F2).
18. Endpoint biologici (principali)	Tasso di schiusa (F1 e F2); sopravvivenza (F1, dalla schiusa a 4 sdf (fine stadio larvale/inizio stadio giovanile), da 4 a 9 (o 10) sdf (da inizio stadio giovanile a subadulti) e da 9 a 15 sdf (da subadulti a soppressione adulti); crescita (F1, lunghezza e peso a 9 e 15 sdf); caratteri sessuali secondari (F1, papille della pinna anale a 9 e 15 sdf); vitellogenina (F1, mRNA della *vtg* o proteina VTG a 15 sdf); sesso fenotipico (F1, tramite istologia delle gonadi a 15 sdf); riproduzione (F0 e F1, fecondità e fertilità per 21 giorni); tempo di deposizione (F1); e istopatologia (F1, gonadi, fegato e reni a 15 sdf).
19. Criteri di validità della prova	Ossigeno disciolto ≥ 60 % del valore di saturazione dell'aria; temperatura media dell'acqua di 24-26°C per tutta la durata della prova; riproduzione riuscita di ≥ 65 % delle femmine nei controlli; fecondità quotidiana media di ≥ 20 uova nei controlli; tasso di schiusa di ≥ 80 % (in media) nei controlli (in ciascuna delle generazioni F1 e F2); sopravvivenza dopo la schiusa fino a 3 sdf di ≥ 80 % (in media) e da 3 sdf fino alla soppressione per la generazione di ≥ 90 % (in media) nei controlli (F1), le concentrazioni della sostanza chimica in esame in soluzione devono essere mantenute in modo soddisfacente entro un intervallo del ± 20 % dei valori misurati medi.

Appendice 4

ORIENTAMENTI SU VALORI DI CONTROLLO TIPICI

Va osservato che questi valori di controllo sono basati su un numero limitato di studi di validazione e possono essere soggetti a modifiche alla luce di ulteriori esperienze.

Crescita

Il peso e la lunghezza sono misurati per tutti i pesci prelevati per un campionamento a 9 (o 10) e 15 settimane dopo la fecondazione (sdf). Secondo questo protocollo il peso fresco atteso a 9 sdf è di 85-145 mg per i maschi e di 95-150 mg per le femmine. Il peso atteso a 15 sdf è di 250-330 mg per i maschi e di 280-350 mg per le femmine. Anche se per singoli pesci si possono riscontrare deviazioni significative da questi valori, un peso medio nei controlli che si discosta sostanzialmente da questi valori, e in particolare se è inferiore, indica problemi di alimentazione, di controllo della temperatura, di qualità dell'acqua o di malattia o una combinazione di diversi di questi fattori.

Schiusa

Il tasso di schiusa nei controlli è generalmente intorno al 90 %, tuttavia valori non superiori all'80 % non sono eccezionali. Un tasso di schiusa inferiore al 75 % può indicare un'agitazione insufficiente delle uova in fase di sviluppo o una cura insufficiente nella manipolazione delle uova, come un ritardo nella rimozione delle uova morte, con conseguente infezione micotica.

Sopravvivenza

I tassi di sopravvivenza fino a 3 sdf dalla schiusa e dopo 3 sdf sono generalmente del 90 % o superiori per i controlli, ma tassi di sopravvivenza non superiori all'80 % nei primi stadi di vita non sono allarmanti. Tassi di sopravvivenza nei controlli inferiori all'80 % sono preoccupanti e possono indicare una pulizia insufficiente delle vasche, con conseguente perdita di larve per malattia o asfissia dovuta agli scarsi livelli di ossigeno disciolto. La mortalità può anche risultare da ferite prodottesi durante la pulizia della vasca e dalla perdita di larve nel sistema di drenaggio della vasca.

Gene della vitellogenina

Se i livelli assoluti del gene della *vitellogenina* (*vtg*), espressi in numero di copie/ng dell'mRNA totale, possono variare notevolmente da un laboratorio all'altro a motivo delle procedure o della strumentazione utilizzate, il rapporto della *vtg* dovrebbe essere circa 200 volte più grande nelle femmine di controllo rispetto ai maschi di controllo. Non è raro che questo rapporto raggiunga valori compresi tra 1 000 e 2 000; rapporti inferiori a 200 sono invece sospetti e possono indicare problemi di contaminazione dei campioni o problemi legati alle procedure e/o ai reagenti utilizzati.

Caratteri sessuali secondari

Per i maschi il valore normale dei caratteri sessuali secondari, definiti come il numero totale di segmenti con papille nei raggi della pinna anale, è di 40-80 segmenti a 9-10 sdf. Entro le 15 sdf il valore per i maschi di controllo dovrebbe essere compreso tra 80 e 120 e pari a 0 per le femmine di controllo. Per motivi non conosciuti in casi rari alcuni maschi non presentano papille a 9 sdf, ma poiché tutti i maschi di controllo sviluppano papille entro 15 sdf, questo è probabilmente dovuto a un ritardo di sviluppo. La presenza di papille nelle femmine di controllo indica la presenza di maschi XX nella popolazione.

Maschi XX

L'incidenza normale dei maschi XX nei pesci di coltura sembra essere al massimo del 4 % a 25 C° e aumenta con l'aumentare della temperatura. È necessario prendere provvedimenti per ridurre al minimo la proporzione di maschi XX nella popolazione. Poiché l'incidenza di maschi XX sembra avere una componente genetica ed è pertanto ereditaria, un mezzo efficace per ridurre l'incidenza di maschi XX nella popolazione consiste nel monitorare lo stock coltivato e accertarsi che i maschi XX non siano utilizzati per la riproduzione.

Attività di riproduzione (deposizione di uova)

L'attività di riproduzione nelle repliche di controllo deve essere monitorata quotidianamente prima di effettuare la valutazione della fecondità. Si può valutare visivamente, dal punto di vista qualitativo, se le coppie di controllo depongono uova. Entro la 12-14 sdf la maggior parte delle coppie di controllo dovrebbe deporre uova. Uno scarso numero di coppie che depongono uova in questa fase indica problemi potenziali di salute, maturità o benessere dei pesci.

Fecondità

A 12-14 sdf femmine di medaka in buona salute e ben nutrite generalmente producono ogni giorno da 15 a 50 uova. La produzione di uova per 16 delle 24 coppie riproduttrici di controllo raccomandate (> 65 %) dovrebbe essere superiore a 20 uova per coppia al giorno e può arrivare fino a 40 uova al giorno. Una produzione inferiore può indicare problemi di maturità, malnutrizione o cattiva salute delle coppie riproduttrici.

Fertilità

La percentuale di uova fertili per le coppie riproduttrici di controllo è generalmente del 90 %, ma valori pari o superiori al 95 % non sono rari. Tassi di fertilità inferiori all'80 % nelle uova di controllo sono sospetti e possono indicare individui in cattiva salute o condizioni di coltura non ottimali.

Appendice 5

ESEMPIO DI PROGRAMMA DI ALIMENTAZIONE

Nella tabella 1 figura un esempio di programma di alimentazione volto a garantire una crescita e uno sviluppo adeguati per una riproduzione sostenuta. Deviazioni da questo programma di alimentazione sono possibili, ma si raccomanda di testarle per verificare che la crescita e la riproduzione osservate siano accettabili. Per seguire il programma di alimentazione suggerito occorre, prima di cominciare la prova, determinare il peso secco dei naupli di artemia per volume di impasto liquido di naupli di artemia. Per far questo si pesa un volume definito di tale impasto, che è stato seccato per 24 ore a 60 °C in recipienti prepesati. Per tener conto del peso del sale nell'impasto liquido occorre seccare e pesare anche un volume identico della stessa soluzione salina utilizzata nell'impasto e sottrarre il peso del sale dal peso dell'impasto liquido di naupli di artemia. In alternativa i naupli di artemia possono essere filtrati e risciacquati con acqua distillata prima di essere seccati; si evita in questo modo la necessità di misurare il peso di un campione contenente unicamente sale. Queste informazioni permettono di convertire i dati della tabella 1 dal peso secco dei naupli di artemia al volume di impasto liquido di naupli di artemia da somministrare a ciascun pesce. Si raccomanda inoltre di pesare ogni settimana aliquote dell'impasto liquido di naupli di artemia per verificare che il peso secco somministrato sia corretto.

Tabella 1

Esempio di un programma di alimentazione

Giorni (dopo la schiusa)	Naupli di artemia (mg peso secco/pesce/giorno)
Giorno 1	0,5
Giorno 2	0,5
Giorno 3	0,6
Giorno 4	0,7
Giorno 5	0,8
Giorno 6	1,0
Giorno 7	1,3
Giorno 8	1,7
Giorno 9	2,2
Giorno 10	2,8
Giorno 11	3,5
Giorno 12	4,2
Giorno 13	4,5

Giorni (dopo la schiusa)	Naupli di artemia (mg peso secco/pesce/giorno)
Giorno 14	4,8
Giorno 15	5,2
Giorni 16-21	5,6
Settimana 4	7,7
Settimana 5	9,0
Settimana 6	11,0
Settimana 7	13,5
Settimana 8 - soppressione	22,5

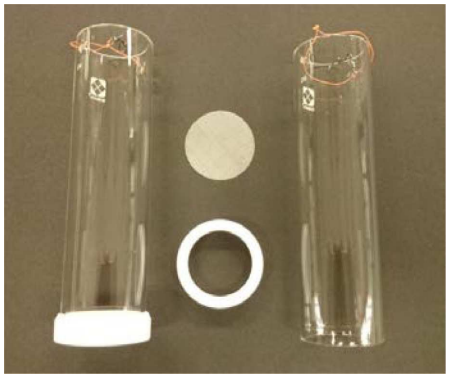
Appendice 6

ESEMPI DI UN INCUBATORE DI UOVA

Esempio A

Questo incubatore consiste in un tubo da centrifuga in vetro munito di una sezione trasversale, collegato da un manicotto in acciaio inossidabile e mantenuto in posizione da un tappo a vite per centrifuga. Un tubicino in vetro o in acciaio inossidabile che passa attraverso il tappo ed è posizionato vicino al fondo arrotondato dell'incubatore ha la funzione di diffondere delicatamente le bolle d'aria per mettere le uova in sospensione e di ridurre la trasmissione di infezioni micotiche da parte di organismi saprofiti tra le uova, facilitando al tempo stesso gli scambi chimici tra l'incubatore e la vasca in cui è posto.

Esempio B



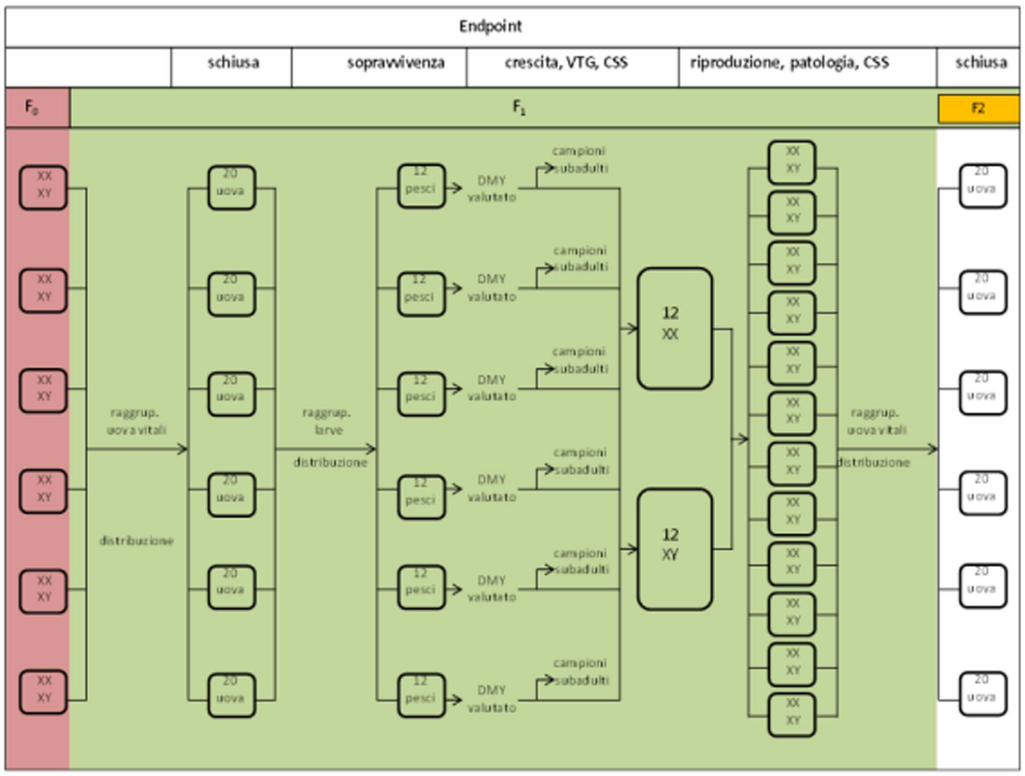
Questo incubatore è costituito da un corpo cilindrico in vetro (5 cm di diametro e 10 cm di altezza) e da una rete metallica inossidabile (0.25 φ e 32 maglie) fissata al fondo del corpo cilindrico da un anello in PTFE. Gli incubatori sono sospesi a una barra a movimento verticale posizionata sopra le vasche e agitati verticalmente (con un movimento di circa 5 cm di ampiezza) secondo un ciclo appropriato per le uova di medaka (ogni 4 secondi circa).

Appendice 7

Diagramma Schematico del Raggruppamento e Della Ripartizione Delle Repliche Secondo il Metodo di Prova Meogrt

Figura 1

Raggruppamento e ripartizione delle repliche dall'inizio alla fine della prova MEOGRT. La figura rappresenta un trattamento o la metà di un gruppo di controllo. A motivo del raggruppamento l'identità delle repliche non è continua per tutta la durata della prova. Si noti che il termine «uova» si riferisce a uova vitali e fecondate (equivale a embrioni).



Trattamenti e replica

Il metodo di prova raccomanda cinque trattamenti con la sostanza chimica in esame utilizzando materiale di grado tecnico e un controllo negativo. Il numero di repliche per trattamento non rimane costante per tutta la durata della prova MEOGRT e il numero di repliche nel controllo trattato è doppio rispetto a ciascun trattamento con la sostanza chimica in esame. Nella F0 ogni trattamento con la sostanza chimica in esame prevede sei repliche, mentre il controllo negativo trattato prevede 12 repliche. I solventi sono vivamente sconsigliati; qualora sia utilizzato un solvente, è necessario inserire nella relazione sul MEOGRT la giustificazione per l'utilizzo del solvente e per la sua scelta. Inoltre se è utilizzato un solvente sono necessari due tipi di controlli: a) un controllo con il solvente e b) un controllo negativo. Ciascuno di questi due gruppi di controllo deve comportare una serie completa di repliche in tutte le fasi di svolgimento della prova MEOGRT. Questa struttura di repliche resta inalterata per tutto lo sviluppo dell'organismo sperimentale nella generazione F1 (e nella generazione F2 fino alla schiusa). Tuttavia nello stadio adulto, quando le coppie riproduttrici di F1 sono formate, il numero di repliche di coppie riproduttrici per trattamento è raddoppiato per un risultato ottimale; vi sono pertanto fino a 12 coppie di repliche in ciascun trattamento con la sostanza chimica in esame e 24 coppie di repliche nel gruppo di controllo (e altre 24 coppie di repliche nel controllo con il solvente, se necessario). La determinazione della schiusa delle uova deposte dalle coppie F1 è effettuata sulla stessa struttura di repliche utilizzata per le uova deposte dalle coppie F0, ossia inizialmente sei repliche per trattamento con la sostanza chimica in esame e 12 repliche nel o nei gruppi di controllo.

Appendice 8

CONTEGGIO DELLE PAPILLE DELLA PINNA ANALE

MATERIALI E REAGENTI PRINCIPALI

— Microscopio a dissezione (con macchina fotografica facoltativa)

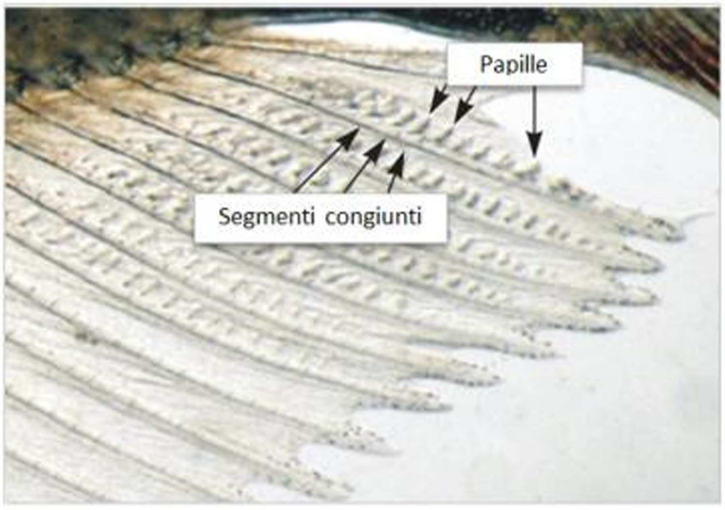
— Fissativo (ad es., di Davidson (quello di Bouin è sconsigliato), se il conteggio non è effettuato a partire dall'analisi dell'immagine

Procedura

Dopo la necropsia occorre ottenere un'immagine della pinna anale per poter agevolmente contare le papille della pinna anale. Anche se si consiglia di utilizzare l'immagine, è possibile fissare la pinna anale con fissativo di Davidson o con un altro fissativo adeguato per 1 minuto circa. È importante tenere la pinna anale piatta durante la fissazione per facilitare il conteggio delle papille. La carcassa con la pinna anale può essere conservata nel fissativo di Davidson o in un altro fissativo adeguato fino al momento dell'analisi. Contare il numero di segmenti congiunti (si veda la **figura 1**) con papille che sporgono dal margine posteriore del segmento congiunto.

Figura 1

Papille della pinna anale



Appendice 9

CRONOLOGIA DETTAGLIATA DELLA PROVA MEOGRT

Settimane di prova 1-3 (F0)

I pesci riproduttori della generazione F0 che hanno soddisfatto i criteri di selezione (cfr. i paragrafi 16-20) sono esposti per tre settimane per consentire ai gameti e ai tessuti gonadici in sviluppo di essere esposti alla sostanza chimica in esame. Ogni vasca di replica contiene una sola coppia riproduttrice (coppia femmina XX-maschio XY). Le uova deposte sono raccolte e contate e la loro fertilità è valutata per 21 giorni consecutivi, cominciando dal 1° giorno di prova.

Settimana di prova 4 (F0 e F1)

È preferibile che le uova fecondate e vitali (embrioni) siano raccolte in un solo giorno; tuttavia, se non vi sono embrioni a sufficienza, essi possono essere raccolti su un arco di due giorni. Se raccolti in due giorni, tutti gli embrioni dello stesso trattamento raccolti il primo giorno sono raggruppati con quelli raccolti il secondo giorno. Quindi la totalità degli embrioni di ciascun trattamento così raggruppati è distribuita in modo casuale negli incubatori di replica in proporzione di 20 embrioni per incubatore. La mortalità delle uova fecondate (embrioni) è controllata e registrata quotidianamente. Le uova morte sono rimosse dagli incubatori (la morte di uova fecondate può essere denotata, soprattutto nei primi stadi, da marcata perdita di trasluciditá e cambiamento di colorazione dovute a coagulazione e/o precipitazione delle proteine, con conseguente aspetto bianco opaco; OCSE (2010).

Nota: Se un solo trattamento necessita di un secondo giorno di raccolta, tutti i trattamenti (compresi i controlli) devono seguire la stessa procedura. Se dopo il secondo giorno di raccolta il numero di embrioni nell'ambito di un trattamento è insufficiente per poter caricare 20 embrioni per incubatore, ridurre a 15 il numero di embrioni per incubatore caricati per questo trattamento specifico. Se gli embrioni non sono sufficienti per caricarne 15 per incubatore, ridurre il numero di incubatori di replica fino a un numero che permetta di caricare 15 embrioni per incubatore. Inoltre nella F0 si possono aumentare le coppie riproduttrici per trattamento e per i controlli in modo da produrre più uova e raggiungere il numero consigliato di 20 per replica.

Nel 24° giorno di prova le coppie riproduttrici della F0 sono soppresse con metodi non cruenti e il loro peso e lunghezza sono registrati. Se necessario, è possibile mantenere in vita per 1-2 giorni in più le coppie riproduttrici della F0 per avviare la generazione F1.

Settimane di prova 5-6 (F1)

Uno o due giorni prima dell'inizio previsto della schiusa fermare o ridurre l'agitazione delle uova in incubazione per accelerare la schiusa. Poiché ogni giorno si schiudono alcuni embrioni, le larve sono raggruppate per trattamento e distribuite sistematicamente nelle vasche di replica loro destinate nell'ambito di un trattamento specifico; ogni vasca non può contenere più di 12 larve. Tale ripartizione è effettuata casualmente; le larve sono selezionate e poste una per una in repliche successive in modo casuale passando in ordine da una replica del trattamento considerato alla successiva fino a quando tutte le repliche nel trattamento comportano 12 larve. Se non vi sono larve a sufficienza per riempire tutte le repliche, fare in modo che quante più repliche possibili contengano 12 larve per avviare la fase F1.

Le uova che non si sono schiuse entro il doppio del giorno mediano di schiusa nei controlli sono considerate non vitali e scartate. Il numero di larve è registrato e il tasso di schiusa è calcolato in ciascuna replica.

Settimane di prova 7-11 (F1)

La sopravvivenza delle larve è controllata e registrata quotidianamente in tutte le repliche. Il 43° giorno di prova il numero di pesci sopravvissuti in ogni replica è registrato insieme al numero iniziale di larve poste nella replica (valore nominale: dodici). Questo permette di calcolare la percentuale di sopravvivenza dalla schiusa allo stadio subadulto.

Settimana di prova 12 (F1)

Nel 78°-85° giorno di prova si procede a un piccolo prelievo tissutale dalla pinna caudale di ogni pesce per determinare il sesso genotipico dell'individuo. Questa informazione è utilizzata per formare le coppie riproduttrici.

Entro tre giorni dalla determinazione del sesso genotipico di ogni pesce sono formate casualmente 12 coppie riproduttrici per trattamento e 24 coppie per controllo. Due pesci XX e XY da ciascuna replica sono selezionati casualmente, raggruppati per sesso e poi selezionati in modo casuale per formare una coppia riproduttrice (ossia una coppia XX-XY). Si procede a formare un minimo di 12 repliche per trattamento con la sostanza chimica e un minimo di 24 repliche per il controllo, con una coppia riproduttrice per replica. Se una replica non dispone di due pesci XX o due pesci XY che possono essere raggruppati, occorre procurarsi pesci del sesso genotipico richiesto da altre repliche nello stesso trattamento.

I pesci rimasti (massimo 8 pesci per replica) sono soppressi con metodi non cruenti e sottoposti a campionamento per i vari endpoint subadulti. I dati relativi al gene *dmy* (XX o XY) per tutti i campioni subadulti sono conservati in modo che sia possibile correlare tutti i dati relativi agli endpoint al sesso genetico di ciascun individuo.

Settimane di prova 13-14 (F1)

L'esposizione continua durante il passaggio delle coppie riproduttrici subadulte allo stadio adulto. Il 98° giorno di prova (ossia il giorno che precede l'inizio della raccolta delle uova) le uova sono prelevate dalle vasche e dalle femmine.

Settimane di prova 15-17 (F1)

Le uova deposte sono raccolte quotidianamente per 21 giorni consecutivi in ogni replica e la loro fecondità e fertilità sono valutate.

Settimana di prova 18 (ripetizione della settimana di prova 4) (F1 e F2)

Il 120° giorno di prova si procede la mattina alla raccolta delle uova in ogni vasca di replica. Le uova raccolte sono valutate e le uova fecondate (private dei filamenti) di ogni coppia riproduttrice sono raggruppate per trattamento e distribuite sistematicamente negli incubatori in proporzione di 20 uova fecondate per incubatore. Gli incubatori possono essere posti in «vasche per incubatori» separate per ogni trattamento o nella vasca di replica che, dopo la schiusa, conterrà le larve schiuse. È preferibile che gli embrioni siano raccolti in un solo giorno; tuttavia, se non vi sono embrioni a sufficienza, essi possono essere raccolti su un arco di due giorni. Se raccolti in due giorni, tutti gli embrioni dello stesso trattamento raccolti il primo giorno sono raggruppati con quelli raccolti il secondo giorno. Quindi la totalità degli embrioni di ciascun trattamento così raggruppati è distribuita in modo casuale negli incubatori di replica in proporzione di 20 embrioni per incubatore. Nota: se un solo trattamento necessita di un secondo giorno di raccolta, tutti i trattamenti (compresi i controlli) devono seguire la stessa procedura. Se dopo il secondo giorno di raccolta il numero di embrioni in un determinato trattamento è insufficiente per poter caricare 20 embrioni per incubatore, ridurre a 15 il numero di embrioni per incubatore per questo trattamento specifico. Se gli embrioni non sono sufficienti per caricarne 15 per incubatore, ridurre il numero di incubatori di replica fino a un numero che permetta di caricare 15 embrioni per incubatore.

Il 121° giorno di prova (o il 122° se è necessario un giorno supplementare per accertarsi che la F2 sia stata ben avviata) le coppie riproduttrici della F1 sono soppresse con metodi non cruenti e analizzate per misurare gli endpoint adulti. Se necessario, si possono mantenere in vita per 1-2 giorni in più le coppie riproduttrici della F1 per avviare la generazione F2.

Settimane di prova 19-20 (F2)

Uno o due giorni prima dell'inizio previsto della schiusa fermare o ridurre l'agitazione delle uova in incubazione per accelerare la schiusa. Se la prova termina con la schiusa della F2, ogni giorno le larve sono contate e scartate. (Gli embrioni che non si sono schiusi dopo un periodo di incubazione prolungato, definito come il doppio del giorno mediano di schiusa nei controlli, sono considerati non vitali).

Appendice 10

ANALISI STATISTICA

I tipi di dati biologici generati con la prova MEOGRT non sono specifici di questa prova e, salvo per i dati di patologia, sono stati messi a punto numerosi metodi statistici che consentono di analizzare correttamente dati analoghi sulla base delle loro caratteristiche, in particolare normalità e omogeneità della varianza, e sulla base del fatto che lo studio si presti alla verifica di ipotesi o all'analisi di regressione, a test parametrici o non parametrici, ecc. In linea generale, le analisi statistiche consigliate sono conformi alle raccomandazioni dell'OCSE sui dati di ecotossicità (OCSE 2006); la figura 2 illustra un diagramma decisionale per l'analisi dei dati della prova MEOGRT.

Si presuppone che gli insiemi di dati forniscano per lo più risposte monotone. Occorre inoltre considerare se utilizzare un test statistico unilaterale o bilaterale. Si consiglia di utilizzare test unilaterali, a meno che per motivi biologici questa soluzione non sia appropriata. La sezione che segue raccomanda test statistici specifici, ma se metodi statistici più appropriati e/o più potenti sono messi a punto per essere applicati ai dati specifici generati con la prova MEOGRT, è opportuno utilizzarli per beneficiare di tali vantaggi.

I dati della prova MEOGRT devono essere analizzati separatamente per ciascun sesso genotipico. Esistono due strategie per analizzare i dati relativi ai pesci che presentano un'inversione sessuale (maschi XX o femmine XY): 1) escludere dalla prova tutti i dati relativi ai pesci che presentano un'inversione sessuale, salvo per quanto riguarda la prevalenza dell'inversione sessuale in ciascuna replica; 2) lasciare i dati relativi ai pesci che presentano un'inversione sessuale ed effettuare un'analisi sulla base del genotipo.

Dati istopatologici

I dati istopatologici sono comunicati sotto forma di indici di gravità, che sono valutati utilizzando una procedura statistica di recente elaborazione, la Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS), (Green *et al.*, 2014). La correzione di tipo *Rao-Scott* permette di tenere conto delle repliche; la procedura RSCABS *by Slices* (per tranche) tiene conto dell'aspettativa biologica secondo la quale gli indici di gravità tendono ad aumentare con l'aumento delle concentrazioni di trattamento. Per ciascuna diagnosi i risultati dell'RSCAB indicano quali trattamenti comportano una prevalenza di patologia superiore rispetto ai controlli e il livello di gravità corrispondente.

Dati relativi alla fecondità

I dati di fecondità sono analizzati mediante il test di tendenza regressivo di Jonckheere-Terpstra o di Williams per determinare gli effetti del trattamento, purché i dati siano compatibili con una relazione concentrazione-risposta monotona. Con un test regressivo i confronti sono effettuati con un livello di significatività dello 0,05 e senza correzione per il numero di confronti effettuati. I dati dovrebbero essere compatibili con una relazione concentrazione-risposta monotona, ma questo aspetto può essere verificato mediante un'ispezione visiva dei dati o costruendo i contrasti lineari e quadratici delle medie per trattamento dopo una gerarchizzazione dei dati. Tranne qualora il contrasto quadratico sia significativo e il contrasto lineare non lo sia, si effettua il test di tendenza. Altrimenti si utilizza il test di Dunnett per determinare gli effetti del trattamento se i dati presentano una distribuzione normale e varianze omogenee. Se tali condizioni non sono soddisfatte, si utilizza il test di Dunn con correzione di Bonferroni-Holm. Tutti i test indicati sono realizzati indipendentemente da un test globale F o di Kruskal-Wallis. Ulteriori precisazioni sono riportate nell'OCSE 2006.

Possono essere utilizzati metodi alternativi, come un modello lineare generalizzato con errori di Poisson per il conteggio delle uova (senza trasformazione), se giustificato dal punto di vista statistico (Cameron e Trividi, 2013). Se si utilizza un approccio alternativo si consiglia di ricorrere a uno specialista di statistica.

Conteggio quotidiano delle uova su una sola generazione

Il modello ANOVA è dato da Y=Tempo*Tempo+Trattamento + *Trattamento + Tempo*Trattamento + *Tempo*Trattamento, con effetti casuali di replica(Generazione*Trattamento) e Tempo*Replica(Trattamento), consentendo componenti di varianza diseguali per entrambi i tipi su più generazioni. In questo contesto «Tempo» si riferisce alla frequenza del conteggio delle uova (ad es. giorno o settimana). Si tratta di un'analisi su misure ripetute: le correlazioni tra osservazioni sulle stesse repliche rendono conto della natura dei dati in quanto misure ripetute.

I principali effetti del trattamento sono sottoposti al test di Dunnett (o di Dunnett-Hsu), che permette di correggere il numero di confronti. Queste correzioni sono necessarie per l'effetto principale di generazione o tempo in quanto questi due fattori non sono associati a un livello di «controllo» e ogni coppia di livelli rappresenta un confronto di potenziale interesse. Nei due casi, se il test F per l'effetto principale è significativo al livello 0,05, i confronti tra coppie di diversi livelli di tale fattore possono essere testati al livello 0,05 senza ulteriori correzioni.

Il modello comprende interazioni a due e tre fattori, così che un effetto principale per, ad esempio, il tempo può non essere significativo anche se il tempo ha un impatto significativo sui risultati. Quindi, se un'interazione a due o tre fattori comprendente il tempo è significativa al livello 0,05, si possono accettare i confronti dei livelli di tempo al livello di significatività 0,05 senza ulteriori correzioni.

Seguono i test F per la significatività del trattamento nel tempo, ossia le *tranche* (*slices*) nella tabella ANOVA. Se, ad esempio, la *tranche* corrispondente al trattamento applicato alla generazione F1 e al tempo 12 è significativa al livello 0,05, allora i confronti tra coppie per il trattamento applicato alla generazione F1 e al tempo 12 possono essere accettati al livello 0,05 senza ulteriori correzioni. Norme analoghe si applicano ai test relativi al tempo nella generazione F1 in un trattamento e alla generazione associata a un tempo e un trattamento dati.

Infine per i confronti che non rientrano in nessuna delle categorie di cui sopra, i confronti devono essere corretti utilizzando la correzione dei valori p secondo Bonferroni-Holm. Maggiori informazioni sulle analisi di tali modelli si trovano in Hocking (1985) e Hochberg e Tamhane (1987).

In alternativa i dati grezzi sono registrati e presentati nella relazione sullo studio come la fecondità (numero di uova) per replica per ogni giorno. Si deve calcolare la media dei dati grezzi per replica e applicare una trasformazione in radice quadrata. Un'ANOVA a un fattore deve essere calcolata sulle medie trasformate per replica, seguita dai contrasti di Dunnett. Può essere utile anche esaminare visivamente i dati di fecondità di ciascun trattamento e/o replica con un grafico a dispersione che rappresenta la distribuzione dei dati nel tempo. Questo metodo consentirà una valutazione informale degli effetti potenziali nel tempo.

Analisi di tutti gli altri dati biologici

Le analisi statistiche sono fondate sull'ipotesi che se le dosi sono correttamente selezionate i dati saranno monotoni. Si presume pertanto che i dati siano monotoni e la loro monotonicità è formalmente valutata mediante contrasti lineari e quadratici. Se i dati sono monotoni, si raccomanda di procedere a un test di tendenza di Jonckheere-Terpstra sulle medie delle repliche (come consigliato nell'OCSE 2006). Se il contrasto quadratico è significativo e il contrasto lineare non lo è, i dati sono considerati non monotoni.

Se i dati sono non monotoni, in particolare a causa della risposta ridotta del trattamento più elevato o dei due trattamenti più elevati, occorre valutare l'opportunità di escludere l'insieme di dati e di procedere all'analisi senza questi trattamenti. Tale decisione necessiterà del parere di un esperto e dovrà essere fondata su tutti i dati disponibili, in particolare quelli che indicano una tossicità manifesta a questi livelli di trattamento.

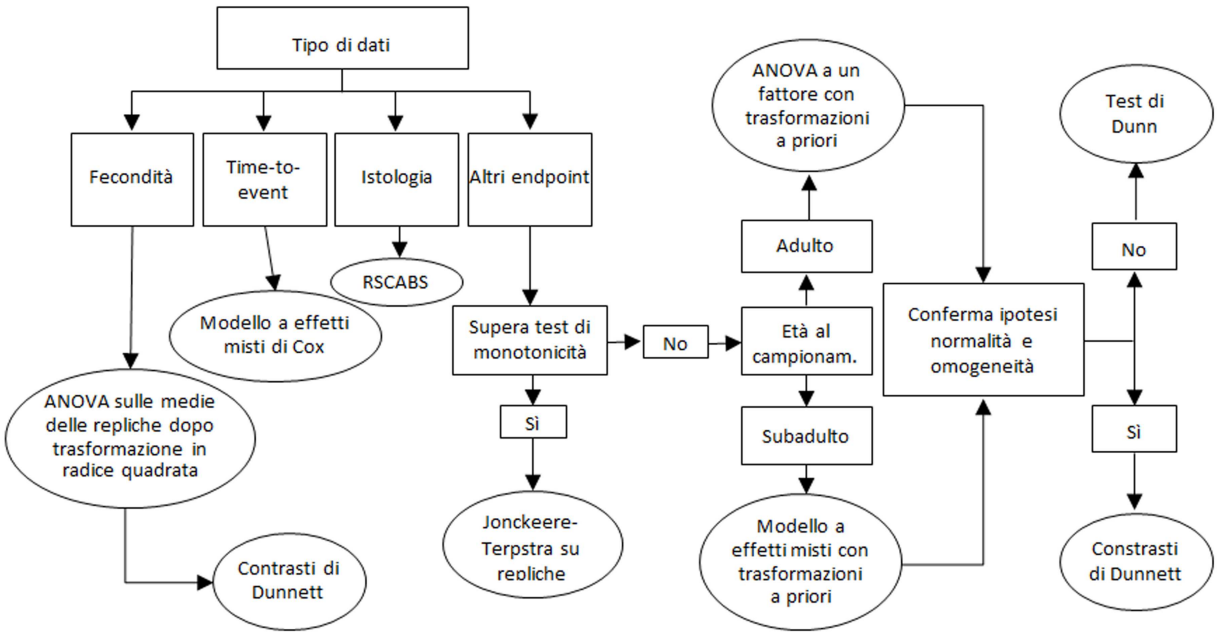
Per il peso e la lunghezza non si consiglia di trasformare i dati, anche se a volte questo può risultare necessario. Una trasformazione logaritmica è invece consigliata per i dati relativi alla vitellogenina; una trasformazione in radice quadrata è consigliata per i dati CSS (papille della pinna anale); una trasformazione in radice quadrata dell'arcoseno è consigliata per i dati relativi al tasso di schiusa, alla percentuale di sopravvivenza, al rapporto numerico tra i sessi e alla percentuale di uova fertili. Il tempo fino alla schiusa e il tempo fino alla prima deposizione sono trattati come dati di tipo «time-to-event» e gli embrioni che non si schiudono nel periodo stabilito o le repliche che non depongono sono trattati come dati censurati a destra. Il tempo fino alla schiusa è calcolato a partire dal giorno mediano di schiusa di ogni replica. Questi endpoint sono analizzati utilizzando un modello a effetti misti a rischi proporzionati di Cox.

I dati biologici relativi ai campioni di adulti sono misurati una volta per replica, ossia vi è un pesce XX e un pesce XY per vasca di replica. Si raccomanda pertanto di procedere a un'ANOVA a un fattore sulle medie delle repliche. Se le ipotesi dell'ANOVA (normalità e omogeneità della varianza quale valutate sui residui dell'ANOVA mediante, rispettivamente, test di Shapiro-Wilks e test di Levene) sono confermate, i contrasti di Dunnett devono essere utilizzati per determinare i trattamenti che differivano dal controllo. D'altro canto, se le ipotesi dell'ANOVA non sono confermate, occorre procedere a un test di Dunn per determinare quali trattamenti differivano dal controllo. Si raccomanda una procedura analoga per i dati sotto forma di percentuali (fertilità, schiusa e sopravvivenza).

I dati biologici ricavati dai campioni subadulti comportano da 1 a 8 misurazioni per replica, il che significa che si può avere un numero variabile di individui che contribuiscono alla media delle repliche per ogni sesso genotipico. Si consiglia pertanto di utilizzare un modello ANOVA a effetti misti seguito dai contrasti di Dunnett se le ipotesi di normalità e omogeneità della varianza sono confermate (sui residui dell'ANOVA a effetti misti). Se le ipotesi non sono state confermate, occorre procedere a un test di Dunn per determinare quali trattamenti differivano dal controllo.

Figura 2

Diagramma decisionale delle procedure statistiche raccomandate per l'analisi dei dati della prova MEOGRT



BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(2) Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.

(3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.

(4) Hochberg Y and Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

C.53 METODO DI PROVA SULLA CRESCITA E LO SVILUPPO DELLE LARVE DI ANFIBIO (LAGDA)

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 241 (2015). La necessità di sviluppare e validare un protocollo sperimentale in grado di individuare e di caratterizzare le conseguenze dannose dell'esposizione a sostanze chimiche tossiche negli anfibi deriva dai timori che il livello attuale delle sostanze chimiche presenti nell'ambiente sia tale da indurre effetti nocivi sull'uomo e sulla fauna selvatica. La linea guida dell'OCSE per il saggio sulla crescita e lo sviluppo delle larve di anfibio (*Larval Amphibian Growth and Development Assay* - LAGDA) descrive prove di tossicità condotte su una specie di anfibi che considerano la crescita e lo sviluppo dalla fecondazione fino all'inizio dello stadio giovanile, valutando (nel corso di 16 settimane, in genere) lo sviluppo iniziale, la metamorfosi, la sopravvivenza, la crescita e la maturazione parziale del sistema riproduttivo. Esso consente inoltre di misurare una serie di altri endpoint in vista della valutazione diagnostica di sostanze chimiche sospettate di essere interferenti endocrini o di altri tipi di sostanze con effetti tossici sullo sviluppo e sulla riproduzione. Il metodo descritto nel presente metodo di prova si ispira ai lavori di validazione condotti sulla rana della specie *Xenopus laevis* (Xenopo liscio o rana artigliata africana) da parte dell'Agenzia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti (U.S. EPA), con il sostegno del Giappone (1). Altre specie di anfibi possano essere utilizzate nelle prove sulla crescita e lo sviluppo intese a determinare se il sesso genetico sia una componente importante, tuttavia i metodi specifici e gli endpoint di osservazione dettagliati nel presente metodo di prova si applicano esclusivamente a *Xenopus laevis*.

2. Il LAGDA funge da prova di livello superiore sugli anfibi intesa a raccogliere informazioni più complete sulle relazioni concentrazione-risposta che inducono effetti nocivi; informazioni che possono essere successivamente utilizzate per identificare e caratterizzare i pericoli e per valutare il rischio ecologico. Il metodo di prova si colloca al livello 4 del Quadro concettuale dell'OCSE per le prove e la valutazione delle sostanze che alterano il sistema endocrino; in tale contesto, le prove *in vivo* forniscono inoltre dati relativi agli effetti nocivi sugli endpoint pertinenti per il sistema endocrino (2). Il progetto sperimentale generale comporta l'esposizione di embrioni di *X. laevis* allo stadio di sviluppo 8-10 secondo Nieuwkoop e Faber (NF) (3) a un minimo di quattro diverse concentrazioni della sostanza chimica in esame (distanziate generalmente a intervalli definiti secondo una progressione semi-logaritmica) e uno o più controlli fino a 10 settimane dopo il tempo mediano trascorso fino allo stadio NF62 nel controllo, con un sottocampione intermedio allo stadio NF62 (≤ 45 giorni dopo la fecondazione; di norma circa 45 giorni (dpf). Per ciascuna concentrazione di prova sono testate quattro repliche, con otto repliche per il controllo. Gli endpoint valutati nel corso dell'esposizione (nel sottocampione intermedio e nel campione finale al completamento della prova) includono gli indicatori di tossicità generalizzata: la mortalità, il comportamento anomalo e gli indicatori di crescita (lunghezza e peso), nonché gli endpoint intesi a caratterizzare i meccanismi di azione della tossicità che colpiscono i processi fisiologici mediati dagli estrogeni, dagli androgeni o dalla tiroide. Il metodo mira in via prioritaria ad evidenziare i potenziali effetti sulla popolazione (vale a dire gli effetti negativi su sopravvivenza, sviluppo, crescita e sviluppo riproduttivo) al fine di calcolare la concentrazione senza effetti osservabili (NOEC) o la concentrazione che induce una variazione dell'x % (EC_x) nell'endpoint misurato. Giova notare che gli approcci di tipo EC_x sono raramente adatti per ampi studi di questo tipo, in cui l'aumento del numero di concentrazioni di prova per determinare l'ECx desiderato può risultare impraticabile. Inoltre, il metodo non si applica alla fase di riproduzione propriamente detta. Le definizioni dei termini utilizzati nel presente metodo di prova figurano nell'appendice 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

3. A motivo del numero limitato di sostanze chimiche testate e di laboratori coinvolti nella validazione di questo metodo di prova piuttosto complesso (in particolare la riproducibilità inter-laboratori non è finora documentata da dati sperimentali), si può prevedere che la linea guida n. 241 dell'OCSE sarà rivista e, se necessario, aggiornata quando sarà disponibile un numero sufficiente di studi per verificare l'impatto di questo nuovo disegno sperimentale. Il LAGDA è un importante protocollo sperimentale che permette di studiare i potenziali fattori che contribuiscono al declino della popolazione di anfibi valutando gli effetti dell'esposizione alle sostanze chimiche durante il delicato stadio larvale, in cui gli effetti sulla sopravvivenza e sullo sviluppo, compreso lo sviluppo normale degli organi riproduttivi, possono avere ripercussioni negative sulle popolazioni.

4. La prova è intesa a individuare gli effetti apicali risultanti dai meccanismi endocrini e non endocrini e comprende gli endpoint diagnostici che sono, in parte, specifici dei principali meccanismi di azione endocrini. Si noti che prima dell'elaborazione del LAGDA non esisteva alcuna prova validata che considerasse questa funzione per gli anfibi.

5. Prima di iniziare la conduzione della prova, è importante disporre di informazioni sulle proprietà fisico-chimiche della sostanza chimica in esame, in particolare per poter produrre soluzioni chimiche stabili. È inoltre necessario disporre di un metodo analitico sufficientemente sensibile per verificare le concentrazioni della sostanza chimica in esame. Per una durata di circa 16 settimane, il protocollo necessita in totale di 480 animali, cioè embrioni di *X. laevis* (o di 640 embrioni se si utilizza un controllo con solvente) per garantire che la prova sia sufficientemente potente per valutare gli endpoint osservati a livello della popolazione, quali la crescita, lo sviluppo e la maturazione riproduttiva.

6. Prima di utilizzare il metodo di prova per testare una miscela a fini regolamentari, occorre verificare se esso genererà risultati accettabili nel quadro regolamentare previsto. Inoltre, il presente metodo di prova non valuta direttamente la fecondità e quindi può non essere applicabile ad una fase più avanzata del livello 4 del quadro concettuale dell'OCSE.

FONDAMENTO SCIENTIFICO DEL METODO DI PROVA

7. Gran parte delle conoscenze di cui disponiamo in materia di biologia degli anfibi è stata ottenuta utilizzando la specie di laboratorio *X. laevis*. Questa specie può essere generalmente allevata in laboratorio; l'ovulazione può essere indotta mediante gonadotropina corionica umana (hCG) e gli stock di animali sono facilmente disponibili presso fornitori commerciali.

8. Come tutti i vertebrati, la riproduzione degli anfibi è controllata dall'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (asse HPG) (4). Gli estrogeni e gli androgeni sono mediatori di questo sistema endocrino: controllano lo sviluppo e la fisiologia dei tessuti sessualmente dimorfici. Il ciclo di vita degli anfibi comporta tre distinte fasi in cui l'asse è particolarmente attivo: 1) la differenziazione delle gonadi durante lo sviluppo larvale; 2) lo sviluppo di caratteristiche sessuali secondarie e la maturazione delle gonadi nella fase giovanile; e 3) la riproduzione funzionale degli adulti. In ciascuna di queste tre fasi di sviluppo il sistema endocrino può potenzialmente essere alterato da alcune sostanze chimiche, quali gli estrogeni e gli androgeni, con la conseguenza di perdita di capacità riproduttiva degli organismi.

9. Le gonadi iniziano lo sviluppo nello stadio NF43, quando inizia a formarsi la cresta genitale bipotenziale. La differenziazione delle gonadi inizia a partire dallo stadio NF52, quando le cellule germinali primordiali migrano verso il tessuto medullare (maschi) o rimangono nella regione corticale (femmine) delle gonadi in sviluppo (3). La prima relazione che dimostra che questo processo di differenziazione sessuale delle gonadi è sensibile all'azione delle sostanze chimiche nella specie *Xenopus* risale agli anni 1950 (5) (6). L'esposizione di girini all'estradiolo durante questo periodo di differenziazione delle gonadi dà luogo a inversione sessuale dei maschi che, quando raggiungono l'età adulta, diventano femmine perfettamente funzionali (7) (8). Anche l'inversione funzionale sessuale delle femmine in maschi è possibile ed è stata riportata dopo l'impianto di tessuti testicolari nei girini (9). Tuttavia, sebbene anche

l'esposizione a un inibitore dell'aromatasi determini l'inversione funzionale del sesso nella specie *X. tropicalis* (10), tale effetto non è stato osservato in *X. laevis*. Storicamente, gli effetti tossici sulla differenziazione delle gonadi sono stati valutati mediante l'esame istologico delle gonadi al momento della metamorfosi e l'inversione sessuale poteva essere determinata soltanto mediante analisi del rapporto numerico tra i sessi. Fino a tempi recenti non esisteva alcun modo per determinare direttamente il sesso genetico della specie *Xenopus*. Tuttavia, la recente introduzione di marcatori sessuali nel *X. laevis* consente di determinare il sesso genetico e di individuare direttamente gli animali che hanno subito un cambiamento di sesso (11).

10. Nei giovani maschi, lo sviluppo procede man mano che aumentano i livelli di testosterone nel sangue, corrispondenti allo sviluppo dei caratteri sessuali secondari e dei testicoli. Nelle femmine, l'estradiolo è prodotto dalle ovaie, il che provoca l'apparizione della vitellogenina (VTG) nel plasma, degli oociti vitellogenici nelle ovaie e lo sviluppo di ovidotti (12). Gli ovidotti sono caratteri sessuali secondari femminili che intervengono nella maturazione degli ovociti durante la riproduzione. Gli oociti si ricoprono di un involucro gelatinoso mentre transitano lungo l'ovidotto e si accumulano nell'ovisacco, pronti per la fecondazione. Lo sviluppo dell'ovidotto sembra essere regolato dagli estrogeni, poiché è correlato ai livelli di estradiolo nel sangue nelle specie *X. laevis* (13) e *X. tropicalis* (12). È stato segnalato lo sviluppo di ovidotti nei maschi a seguito di esposizione ai composti di policlorobifenili (14) e di 4-*terz*-ottilfenolo (15).

PRINCIPIO DELLA PROVA

11. Il disegno sperimentale implica l'esposizione per via acquatica di embrioni di *X. laevis* allo stadio di sviluppo NF8-10 a quattro diverse concentrazioni della sostanza chimica in esame e uno o più controlli fino a 10 settimane dopo il tempo mediano trascorso fino allo stadio NF62 nel controllo, con un sottocampione intermedio allo stadio NF62. Anche se può essere possibile somministrare sostanze chimiche fortemente idrofobe anche per via alimentare, finora esistono poche prove che hanno utilizzato questo canale di esposizione. Per ciascuna concentrazione di prova sono testate quattro repliche, con otto repliche per ciascun controllo utilizzato. Gli endpoint valutati nel corso dell'esposizione comprendono quelli che costituiscono indicatori di tossicità generalizzata (ossia, la mortalità, il comportamento anomalo e gli indicatori di crescita (lunghezza e peso), nonché gli endpoint intesi a caratterizzare i meccanismi di azione della tossicità che colpiscono i processi fisiologici mediati dagli estrogeni, dagli androgeni o dalla tiroide (ossia, istopatologia della tiroide, istopatologia delle gonadi e del condotto gonadico, sviluppo anomalo, vitellogenina nel plasma (facoltativo) e rapporti numerici tra sessi genotipici/fenotipici).

CRITERI DI VALIDITÀ DELLA PROVA

12. Affinché la prova sia valida devono essere soddisfatti i seguenti criteri:

— la concentrazione dell'ossigeno disciolto è di ≥ 40 % del valore di saturazione in aria per tutta la durata della prova;

— la temperatura dell'acqua si situa nell'intervallo di 21 ± 1 °C e i differenziali tra le repliche e tra i trattamenti non superano 1,0 °C;

— il pH della soluzione di prova è mantenuto tra 6,5 e 8,5 e i differenziali tra le repliche e tra i trattamenti non superano 0,5;

— i dati disponibili dimostrano che le concentrazioni della sostanza chimica in esame in soluzione sono state mantenute in modo soddisfacente entro un intervallo del ± 20 % dei valori misurati medi;

— la mortalità nel periodo di esposizione è ≤ 20 % in ciascuna replica nei controlli;

— la vitalità è ≥ 70 % nelle uova selezionate per avviare lo studio;

— il tempo mediano verso lo stadio NF62 dei controlli è di ≤ 45 giorni.

— Il peso medio degli organismi di prova allo stadio NF62 e al completamento della prova nei controlli e nei controlli con solvente (se utilizzati) raggiunge rispettivamente 1,0 ± 0,2 e 11,5 ± 3 g.

13. Sebbene non sia un criterio di validità, si raccomanda che per l'analisi siano disponibili almeno tre livelli di trattamento con tre repliche non compromesse. Una mortalità eccessiva, tale da compromettere un trattamento, è definita come > 4 decessi (> 20 %) in 2 o più repliche che non possono essere spiegati da errori tecnici. Almeno tre livelli di trattamento privi di tossicità evidente sono disponibili per l'analisi. I segni di tossicità evidente possono comprendere, a titolo esemplificativo ma non esaustivo, animali che galleggiano in superficie, giacciono sul fondo della vasca, nuotano in modo irregolare o inverso, non risalgono in superficie, non rispondono agli stimoli, presentano anomalie morfologiche (ad. es. deformità degli arti), lesioni emorragiche e edema addominale.

14. Se si osserva una deviazione rispetto ai criteri di validità della prova, le conseguenze vanno analizzate in relazione all'attendibilità dei risultati della prova; tali deviazioni e considerazioni vanno documentate nella relazione sulla prova.

DESCRIZIONE DEI METODI

Strumentazione

15. Normale attrezzatura da laboratorio e in particolare:

(a) Apparecchio di controllo della temperatura (ad es. dispositivi di riscaldamento o raffreddamento regolabili a 21 ° ± 1 °C);

(b) termometro;

(c) microscopio binoculare da dissezione e strumenti da dissezione;

(d) macchina fotografica digitale con risoluzione minima di 4 megapixel e funzione micro (se necessario);

(e) bilancia analitica, in grado di misurare fino a 0,001 mg or 1 μg;

(f) misuratore di ossigeno disciolto e pH-metro;

(g) misuratore dell'intensità luminosa in grado di fornire risultati in lux.

Acqua

Provenienza e qualità

16. Può essere usata l'acqua di diluizione disponibile localmente (ad esempio: acqua di sorgente o acqua di rubinetto filtrata con carbone) che permetta la crescita e lo sviluppo normali dei girini di *X. laevis*; ciò deve essere comprovato da informazioni fattuali. Poiché la qualità dell'acqua può variare in modo significativo da una zona all'altra, la qualità dell'acqua è analizzata, in particolare in mancanza di dati storici sull'uso di tale acqua per allevare girini di anfibi. La misurazione di metalli pesanti (ad esempio Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), dei principali anioni e cationi (es. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), di pesticidi, del carbonio organico totale e dei solidi in sospensione deve essere effettuata prima dell'inizio della sperimentazione e/o, ad esempio, ogni 6 mesi, ove sia noto che l'acqua di diluizione è di qualità relativamente costante. Alcune caratteristiche chimiche di un'acqua di diluizione accettabile sono elencate nell'appendice 2.

Concentrazione di iodio nell'acqua utilizzata per la prova

17. Affinché la ghiandola tiroidea possa sintetizzare gli ormoni della tiroide per sostenere la normale metamorfosi, è necessario che le larve dispongano di un apporto sufficiente di iodio, amministrato mediante una combinazione di acqua e regime alimentare. Attualmente non esistono linee guida fondate su dati empirici per quanto riguarda le concentrazioni minime di iodio nei mangimi o nell'acqua necessarie per garantire un corretto sviluppo. Tuttavia, la disponibilità di iodio può compromettere la capacità di risposta del sistema tiroideo nei confronti delle sostanze attive sulla tiroide; è risaputo che essa influenza l'attività basale della ghiandola ed è pertanto necessario prendere in considerazione questo aspetto nell'interpretazione dei risultati dell'istopatologia della tiroide. Studi precedenti hanno dimostrano che il presente protocollo funziona correttamente quando le concentrazioni di ioduro (I^{-}) nell'acqua di diluizione sono comprese nell'intervallo tra 0,5 e 10 µg/l. Idealmente, la concentrazione minima di iodio nell'acqua di diluizione per tutta la durata della prova è di 0,5 µg/l (aggiunto sotto forma di sale di sodio o di potassio). Quando la prova è eseguita con acqua deionizzata, si deve aggiungere un supplemento di iodio per raggiungere la concentrazione minima di 0,5 µg/l. Le concentrazioni misurate di iodio nell'acqua della prova (cioè, acqua di diluizione) e l'aggiunta di iodio o di altri sali (se utilizzati) sono riportate nella relazione. Il tenore in iodio può anche essere misurato nei mangimi, oltre che nell'acqua di prova.

Sistema di esposizione

18. La prova è stata sviluppata utilizzando un sistema di diluizione a flusso continuo. I componenti del sistema devono essere costituiti di materiale adatto al contatto con l'acqua, come il vetro, l'acciaio inossidabile e/o altri materiali chimicamente inerti. Le vasche di esposizione devono essere di vetro o di acciaio inossidabile, e il volume utilizzabile della vasca dovrebbe essere tra 4,0 e 10,0 l (con una profondità minima dell'acqua di 10-15 cm). Il sistema deve essere in grado di operare con tutte le concentrazioni di esposizione nonché un campione di controllo e un controllo con solvente, se del caso, con quattro repliche per livello di concentrazione e otto per i controlli. La portata del flusso verso ciascuna vasca deve essere costante, in modo da mantenere stabili le condizioni biologiche e l'esposizione chimica. Si raccomanda di mantenere una portata dell'acqua adeguata (ad esempio almeno 5 rinnovi di acqua al giorno) per evitare un calo della concentrazione della sostanza chimica a causa del metabolismo degli organismi sperimentali e dei microrganismi acquatici presenti nell'acquario, di vie di degradazione abiotica (idrolisi, fotolisi) o della dissipazione (volatilizzazione, adsorbimento). Le vasche sperimentali vanno distribuite a caso nel sistema di esposizione, in modo da diminuire gli eventuali effetti connessi alla posizione (incluse lievi variazioni di temperatura, dell'intensità luminosa, ecc.). Ulteriori informazioni sull'installazione di sistemi di esposizione a flusso continuo possono essere ottenute dal documento *ASTM Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians* (16).

Somministrazione della sostanza chimica: preparazione delle soluzioni di prova

19. Per preparare le soluzioni di prova nel sistema di esposizione, si introduca nel sistema una soluzione madre della sostanza chimica in esame mediante una pompa o un altro strumento adeguato. La velocità di flusso della soluzione di riserva deve essere calibrata secondo i dati analitici relativi alle soluzioni di prova prima dell'inizio dell'esposizione, e sottoposta periodicamente a verifica volumetrica durante la prova. La soluzione di prova in ciascuna vasca va rinnovata al ritmo di un minimo di 5 rinnovi in volume/giorno.

20. Il metodo utilizzato per introdurre nel sistema la sostanza chimica in esame è variabile in funzione delle sue caratteristiche fisico-chimiche. Pertanto, prima della prova si devono ottenere informazioni di base sulla sostanza chimica che siano rilevanti per determinarne la stabilità. La formula strutturale, il peso molecolare, la purezza, la stabilità in acqua e alla luce, il pK_a e il K_{ow}, l'idrosolubilità (preferibilmente nel mezzo di prova), la pressione di vapore e i risultati di una prova di pronta biodegradabilità [metodo di prova C.4 (17) o C. 29 (18)] sono informazioni utili sulle proprietà specifiche della sostanza chimica in esame. La solubilità e la pressione di vapore possono essere utilizzate per calcolare la costante di Henry, che indica il rischio di perdite per evaporazione della sostanza chimica durante la prova. La conduzione di tale prova senza le informazioni di cui sopra deve essere considerata attentamente giacché il disegno sperimentale dipende dalle proprietà fisico-chimiche della sostanza chimica in esame e, in assenza di tali dati, i risultati possono essere di difficile interpretazione o apparire privi di senso. Occorre inoltre disporre di un metodo d'analisi affidabile per la determinazione quantitativa della sostanza chimica in esame nelle soluzioni di prova, la cui precisione e il limite di quantificazione siano noti e descritti in letteratura. Le sostanze chimiche in esame solubili in acqua possono essere disciolte in aliquote dell'acqua di diluizione ad una concentrazione che consenta di ottenere il rilascio della concentrazione sperimentale voluta mediante un sistema di flusso continuo. Le sostanze chimiche che sono liquide o solide a temperatura ambiente e moderatamente solubili in acqua possono richiedere saturatori liquido:liquido o liquido:solido (ad esempio, colonna di lana di vetro) (19). Anche se può anche essere possibile somministrare sostanze chimiche fortemente idrofobe attraverso i mangimi, esistono pochi metodi di prova che hanno utilizzato questo canale di esposizione.

21. Le soluzioni di prova alle concentrazioni scelte vanno preparate per diluizione di una soluzione madre. La soluzione madre è preparata di preferenza per semplice miscela o agitazione della sostanza chimica in esame nell'acqua di diluizione, con l'ausilio di mezzi meccanici (agitazione e/o ultrasuoni, ad esempio). Per ottenere una concentrazione adeguata della soluzione madre si possono utilizzare colonne/sistemi di saturazione o metodi di dosaggio passivo (20). Vanno privilegiati i sistemi sperimentali che non fanno uso di co-solventi; tuttavia sostanze chimiche in esame diverse presentano proprietà fisico-chimiche diverse che richiedono approcci diversi di preparazione delle soluzioni acquose per l'esposizione chimica. Si deve tuttavia fare il possibile per evitare solventi e altri vettori in quanto: 1) alcuni solventi stessi possono rivelarsi tossici e/o indurre risposte endocrine indesiderate o inattese; 2) testare le sostanze chimiche ad una concentrazione superiore alla loro solubilità in acqua (il che avviene spesso se si usano solventi) può falsare la determinazione delle concentrazioni efficaci; e 3) il ricorso a solventi nelle prove può portare a lungo termine alla formazione significativa di biofilm associati all'attività microbica, che può avere un impatto sulle condizioni ambientali o sulla capacità di mantenere le concentrazioni di esposizione; 4) in assenza di dati storici che dimostrino che il solvente non influenza i risultati dello studio, l'uso di solventi richiede un trattamento di controllo con solvente che ha implicazioni significative per il benessere degli animali, in quanto sono necessari altri animali per condurre la prova. Nel caso di sostanze chimiche difficili da testare, il solvente può essere utilizzato soltanto come ultima istanza e si deve consultare il documento *OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures* (21) per stabilire la migliore metodologia da seguire. La scelta del solvente è determinata dalle proprietà chimiche della sostanza chimica in esame e la disponibilità dei dati di controllo storici sui solventi. In mancanza di dati storici, occorre determinare l'idoneità di un solvente prima di procedere allo studio definitivo. Nel caso in cui l'uso di un solvente sia inevitabile e si verifichi un'attività microbica (biofilm), nel corso della prova si raccomanda di registrare/annotare nella relazione la presenza di biofilm per vasca (almeno una volta alla settimana). Idealmente, la concentrazione del solvente deve essere mantenuta costante nel controllo con solvente e in tutti i recipienti trattati. Se la concentrazione del solvente non è costante, nel controllo con solvente si deve usare la concentrazione più elevata di solvente per il trattamento. Se si utilizza un solvente come vettore, le concentrazioni massime di solventi non devono superare 100 µl/l o 100 mg/l (21) e si raccomanda di mantenere la concentrazione di solvente più bassa possibile (ad esempio, ≤ 20 µl/l) per evitare potenziali effetti del solvente sugli endpoint misurati (22).

Animali sperimentali

Specie sperimentale

22. La specie sperimentale è *X. laevis* perché: 1) è allevata regolarmente nei laboratorio di tutto il mondo; 2) è facilmente ottenibile da fornitori commerciali; e 3) si tratta di una specie di cui si può determinare il sesso genetico.

Cura e riproduzione degli adulti

23. I metodi idonei di cura e riproduzione della specie *X. laevis* sono descritti in una linea guida standardizzata (23). Le condizioni di alloggiamento e di cura di *X. laevis* sono anch'esse descritte da Read (24). Per favorire la riproduzione, le coppie (3-5) di maschi e femmine adulti ricevono un'iniezione intraperitoneale di gonadotropina corionica umana (HCG). Agli esemplari maschi e femmine vengono iniettati, rispettivamente, circa 800-1 000 UI e 500-800 UI di hCG disciolti in una soluzione salina a 0,6-0,9 % (o soluzione Ringer, una soluzione isotonica salina da utilizzare con gli anfibi). I volumi di iniezione devono essere di circa 10 µl/g di peso corporeo (~1 000 µl). Successivamente, per stimolare la copulazione, le coppie riproduttrici indotte sono mantenute in grandi vasche, al riparo da perturbazioni e

in condizioni statiche. Ciascuna vasca di riproduzione è dotata di un finto doppiofondo formato da una griglia di plastica o acciaio inossidabile (ad es. con maglie di 1,25 cm) che consenta alle uova di cadere sul fondo. Le rane che ricevono un'iniezione di hCG nel tardo pomeriggio depositano generalmente la maggior parte delle loro uova verso metà mattina del giorno successivo. Dopo la deposizione e la fecondazione di una quantità sufficiente di uova, gli adulti sono rimossi dalle vasche di riproduzione. Le uova sono quindi raccolte e l'involucro gelatinoso è rimosso con trattamento di L-cisteina (23). Preparare una soluzione a 2 % di L-cisteina e adattare il pH a 8,1 con 1 M NaOH. Aggiungere questa soluzione a 21 °C in una beuta da 500 ml contenente le uova provenienti da un'unica deposizione e agitare delicatamente per uno o due minuti e successivamente sciacquare accuratamente 6-8 volte con acqua di coltura a 21 °C. Trasferire quindi le uova in un cristallizzatore e determinarne la vitalità, che deve essere > 70 % e gli embrioni in fase di divisione cellulare devono eventualmente presentare solo anomalie minime.

DISEGNO SPERIMENTALE

Concentrazioni di prova

24. Si raccomanda di utilizzare almeno quattro concentrazioni della sostanza chimica in esame e adeguati controlli (compresi, se necessario, controlli con solvente). In generale, si raccomanda di intervallare le concentrazioni di un fattore non superiore a 3,2.

25. Ai fini della presente prova, i risultati degli studi esistenti sugli anfibi vanno utilizzati nella misura del possibile per determinare la concentrazione massima di prova, in modo da evitare concentrazioni manifestamente tossiche. Per determinare tale concentrazione si potrà ricorrere, ad esempio, alle relazioni quantitative struttura-attività, al metodo "read-across" e ai dati degli studi esistenti sugli anfibi quali il saggio sulla metamorfosi degli anfibi, il metodo di prova C.38 (25) e il saggio *Frog Embryo Teratogenesis Assay - Xenopus* (23) e/o le prove sui pesci quali i metodi di prova C.48, C.41 e C.49 (26) (27) (28). Prima di avviare il LAGDA si può effettuare un esperimento di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni (*range-finding*). Si raccomanda che l'esposizione per la determinazione dell'intervallo di concentrazioni sia avviata entro 24 ore dalla fecondazione e continuata per 7-14 giorni (o più, se necessario) e le concentrazioni di prova siano tali che gli intervalli tra le concentrazioni di prova non siano superiori a un fattore 10. L'intervallo di concentrazioni ottenuto servirà a stabilire la concentrazione massima di prova nel LAGDA. Si noti che, se si utilizza un solvente, l'idoneità del solvente (cioè se può avere un impatto sull'esito dello studio) potrebbe essere determinata nel quadro del test di *range-finding*.

Repliche all'interno dei gruppi di trattamento e dei gruppi di controllo

26. Utilizzare almeno quattro repliche per concentrazione di prova e almeno otto repliche per i controlli (e, se necessario, il controllo con solvente) (cioè il numero di repliche nel controllo e l'eventuale controllo con solvente devono essere il doppio del numero di repliche di ciascun gruppo di trattamento, al fine di garantire un'adeguata potenza statistica). Ciascuna replica deve contenere al massimo 20 animali. Il numero minimo di animali trattati dovrebbe essere di 15 (5 per il sottocampione allo stadio NF62 e 10 allo stadio giovanile). Tuttavia, si aggiungono altri animali a ciascuna replica per tener conto della possibile mortalità, mantenendo il numero critico di 15.

PROCEDURA

Sintesi della prova

27. La prova è avviata con embrioni appena deposti (stadio NF8-10) e prosegue fino allo sviluppo delle giovani rane. Gli animali sono esaminati quotidianamente per verificare la mortalità e qualsiasi segno di comportamento anomalo. Allo stadio NF62 un sottocampione di larve (fino a 5 animali per replica) è prelevato per esaminare vari endpoint (tabella 1). Dopo che tutti gli animali hanno raggiunto lo stadio NF66, vale a dire il completamento della metamorfosi (o dopo 70 giorni dall'inizio della prova, se precedente), è effettuata una selezione casuale (ma senza sottocampionamento) di animali che saranno eliminati per ridurne il numero (10 per vasca) (cfr. il paragrafo 43) e i restanti animali continuano ad essere esposti fino a 10 settimane dopo il tempo mediano fino allo stadio di NF62 nel controllo. Al completamento della prova (campionamento delle rane giovani) sono effettuate ulteriori misurazioni (tabella 1).

Condizioni di esposizione

28. Una sintesi completa dei parametri del metodo figura nell'appendice 3. Durante il periodo di esposizione, l'ossigeno disciolto, la temperatura e il pH delle soluzioni di prova sono misurati quotidianamente. La conduttività, l'alcalinità e la durezza sono misurate una volta al mese. Per la temperatura dell'acqua delle soluzioni di prova, i differenziali inter-repliche e inter-trattamenti (nell'arco di un giorno) non devono superare 1,0 °C. Analogamente, per il pH delle soluzioni di prova, i differenziali inter-repliche e inter-trattamenti non devono superare 0,5.

29. Le vasche di esposizione possono essere sifonate quotidianamente per rimuovere i resti di cibo non consumati e i prodotti di scarto, facendo attenzione ad evitare la contaminazione incrociata delle vasche. Si deve prestare la massima attenzione a ridurre al minimo lo stress e i traumi per gli animali, soprattutto durante i trasferimenti, la pulizia delle vasche e la manipolazione delle larve. Analogamente, va evitata qualsiasi attività o condizione stressante, in particolare rumori forti e/o continui, picchiettamenti sulle vasche o vibrazioni nelle vasche.

Durata dell'esposizione alla sostanza chimica in esame

30. L'esposizione è avviata con embrioni appena deposti (stadio NF8-10) e prosegue fino a dieci settimane dopo il tempo mediano dello stadio NF62 (≤ 45 giorni dall'inizio della prova) nel gruppo di controllo. In generale, la durata del LAGDA è di 16 settimane (massimo 17 settimane).

Avvio della prova

31. Sarà stato precedentemente dimostrato che gli animali riproduttori utilizzati per l'avvio della prova sono in grado di generare discendenti geneticamente sessuati (appendice 5). Dopo la deposizione delle uova degli adulti, gli embrioni sono raccolti, trattati con cisteina in modo da eliminare lo strato gelatinoso e sottoposti a controlli per verificarne la vitalità (23). Il trattamento con cisteina consente di manipolare gli embrioni durante lo screening senza che aderiscano alle superfici. Lo screening avviene mediante un microscopio a dissezione utilizzando un contagocce di misura adeguata per rimuovere gli embrioni non vitali. È preferibile utilizzare per la prova embrioni di un'unica deposizione che presenti una vitalità superiore al 70 %. Gli embrioni allo stadio NF8-10 sono ripartiti in modo casuale in vasche di trattamento contenenti un volume adeguato di acqua di diluizione, fino a che ciascuna vasca contenga 20 embrioni. Gli embrioni vanno manipolati con cura durante il trasferimento per ridurre al minimo lo stress ed evitare qualsiasi lesione. Dopo 96 ore dalla fecondazione, i girini devono aver risalito la colonna d'acqua e aver cominciato ad aderire alle pareti della vasca.

Regime alimentare

32. Il regime e la frequenza di alimentazione nei vari stadi di vita di *X. laevis* rappresentano un aspetto molto importante del protocollo LAGDA. Un'alimentazione eccessiva durante la fase larvale determina generalmente un aumento dei casi di scoliosi e della loro gravità (appendice 8) e deve essere pertanto evitata. Per contro, un'alimentazione inadeguata durante la fase larvale si traduce in ritmi di sviluppo estremamente variabili tra i controlli, con il rischio di compromettere la potenza statistico o i risultati della prova. L'appendice 4 illustra il regime alimentare raccomandato per le larve e le rane giovani di *X. laevis* in condizioni di flusso continuo, ma sono ammesse alternative purché gli organismi sperimentali crescano e si sviluppino in modo soddisfacente. Giova notare che se sono misurati gli effetti sul sistema endocrino, si devono utilizzare mangimi privi di sostanze attive sul sistema endocrino quali la farina di soia.

Alimentazione delle larve

33. La dieta raccomandata è costituita da mangimi per l'alimentazione delle trote, da dischi di alghe *Spirulina* e da fiocchi per pesci rossi (ad esempio fiocchi di TetraFin®, Tetra, Germania) mescolati in acqua di coltura (o di diluizione). Tale miscuglio è somministrato tre volte al giorno nei giorni infrasettimanali e una volta al giorno durante i fine settimana. I girini sono alimentati con naupli vivi (di 24 ore) di *Artemia*, due volte al giorno nei giorni infrasettimanali e una volta al giorno durante i weekend a partire dall'8 ° giorno dopo la fecondazione. L'alimentazione delle larve, che deve essere coerente in ciascuna vasca di prova, deve consentire crescita e sviluppo adeguati degli animali sperimentali, al fine di garantire la riproducibilità e la trasferibilità dei risultati della prova: 1) il tempo mediano fino allo stadio NF62 nel controllo deve essere di ≤ 45 giorni; e 2) è raccomandato un peso medio di 1,0 ± 0,2 g allo stadio NF62 nei controlli.

Alimentazione delle rane giovani

34. Una volta terminata la metamorfosi, il regime alimentare consiste di mangimi di prima scelta per gli anfibi di tipo 3/32 (Xenopus Express, FL, USA) (appendice 4). Per i ranocchi (rane al primo stadio giovanile), il granulato è macinato velocemente in un macinacaffè o in un mixer o schiacciato con pestello in un mortaio per ridurne le dimensioni. Quando le rane giovani sono diventate sufficientemente grandi da consumare il granulato intero, la macinazione o la triturazione non sono più necessarie. Gli animali vanno nutriti una volta al giorno. L'alimentazione delle rane giovani deve permettere una crescita e uno sviluppo adeguati degli organismi: al completamento della prova è raccomandato un peso medio di 11,5 ± 3 g per le rane giovani di controllo.

Analisi chimiche

35. Prima di avviare la prova occorre determinare la stabilità della sostanza in esame (ad esempio, solubilità, degradabilità e volatilità) e stabilire tutti i metodi analitici necessari, ad esempio utilizzando le informazioni o le conoscenze disponibili. Se l'amministrazione delle dosi avviene attraverso l'acqua di diluizione, si raccomanda di analizzare ciascuna soluzione di prova da ciascuna delle vasche di replica prima dell'inizio della prova per verificare le prestazioni del sistema. Durante il periodo di esposizione, le concentrazioni della sostanza chimica in esame sono determinate ad intervalli appropriati, preferibilmente ogni settimana per almeno una replica in ciascun gruppo di trattamento, con rotazione delle repliche dello stesso gruppo di trattamento ogni settimana. Si raccomanda che i risultati siano basati sulle concentrazioni misurate. Tuttavia, se la concentrazione della sostanza chimica in esame in soluzione è stata adeguatamente mantenuta nel corso dell'intera prova in un intervallo di ± 20 % della concentrazione nominale, i risultati possono essere calcolati a partire dai valori nominali o misurati. Inoltre, il coefficiente di variazione (CV) delle concentrazioni di prova misurate nel corso dell'intero periodo di prova in un trattamento deve essere mantenuto uguale o inferiore a 20 % in ciascuna concentrazione. Se le concentrazioni misurate non rientrano nell'80-120 % della concentrazione nominale (ad esempio, quando si testano sostanze fortemente biodegradabili o adsorbenti), occorre determinare le concentrazioni efficaci ed esprimerle in rapporto alla media aritmetica delle concentrazioni nelle prove a flusso continuo.

36. Le velocità di flusso dell'acqua di diluizione e della soluzione madre sono controllate a intervalli appropriati (ad esempio tre volte alla settimana) per tutta la durata dell'esposizione. Nel caso di sostanze chimiche che non possono essere rilevate ad alcune o a tutte le concentrazioni nominali (ad esempio, a causa di una rapida degradazione o adsorbimento nelle vasche di prova, o di un marcato accumulo di sostanze chimiche negli organismi degli animali esposti), si raccomanda di adeguare il tasso di ricambio della soluzione di prova in ciascuna vasca al fine di mantenere il più possibile costanti le concentrazioni di prova.

Osservazioni e misurazioni degli endpoint

37. Gli endpoint valutati nel corso dell'esposizione sono quelli indicativi della tossicità, compresi mortalità, comportamenti anomali (ad es. segnali clinici di malattia e/o di tossicità generale) e indicatori di crescita (lunghezza e peso), nonché gli effetti patologici dovuti sia alla tossicità generale che ai meccanismi di azione endocrina che influiscono sui processi fisiologici mediati da estrogeni, androgeni o tiroide. Inoltre, la concentrazione di VTG nel plasma può essere misurata in via facoltativa al completamento della prova. La misurazione della VTG può essere utile per comprendere i risultati dello studio nel contesto dei meccanismi endocrini per i presunti interferenti endocrini. Gli endpoint misurati e la frequenza di misurazione sono riassunti nella tabella 1.

Tabella1

Panoramica degli endpoint del LAGDA

Endpoint (*)	Quotidiano	Campionamento intermedio (campioni di larve)	Conclusione della prova (campioni di esemplari giovani)
Mortalità e anomalie	X		
Tempo fino allo stadio NF62		X	
Isto(pato)logia (tiroide)		X	
Morfometria (crescita in peso e in lunghezza)		X	X
Indice epatosomatico (IES)			X
Rapporti numerici tra sessi genotipici/fenotipici			X
Istopatologia (gonadi, dotti riproduttivi, reni e fegato)			X
Vitellogenina (VTG) (facoltativo)			X

(*) Tutti gli endpoint sono analizzati statisticamente.

Mortalità e osservazioni giornaliere

38. Tutte le vasche sperimentali sono controllate quotidianamente per individuare animali morti e registrarne il numero per ciascuna vasca. Gli animali morti sono rimossi dalla vasca non appena individuati. Lo stadio di sviluppo degli animali morti va classificato come pre-stadio NF58 (che precede l'apparizione degli arti anteriori), tra gli stadi NF58 e NF62, tra gli stadi NF62 e NF63 (tra lo stadio NF62 e il completo assorbimento della coda) o stadio NF66 (post-larvale). I tassi di mortalità superiore al 20 % potrebbero indicare condizioni sperimentali inadeguate o effetti manifestamente tossici della sostanza chimica in esame. Gli animali tendono ad essere più sensibili a episodi di mortalità non dipendenti dalle sostanze chimiche durante i primi giorni di sviluppo che seguono la deposizione delle uova e durante il picco metamorfico. Tale mortalità può risultare dai dati relativi ai controlli.

39. Inoltre, qualsiasi osservazione di comportamenti anomali, malformazioni evidenti (ad esempio, scoliosi), o lesioni, deve essere annotata. Le osservazioni di scoliosi vanno contate (incidenza) e classificate in base alla gravità (ad esempio, non osservabile: NR, minima: 1, moderata: 2, grave 3; appendice 8). Sforzi devono essere compiuti per limitare la prevalenza di scoliosi moderate e gravi (ad esempio, inferiore al 10 % nei controlli) per tutta la durata dello studio, anche se una maggiore prevalenza di anomalie dei controlli non costituisce necessariamente un motivo per interrompere la prova. Si riscontra un comportamento normale quando le larve rimangono sospese nella colonna d'acqua, con la coda più alta della testa, battono la pinna caudale in modo ritmico e regolare, risalgono periodicamente in superficie, muovono gli opercoli e reagiscono agli stimoli. Viceversa, un comportamento anomalo implica, ad esempio, che gli animali galleggiano in superficie, rimangono immobili sul fondo della vasca, nuotano in modo inverso o irregolare, non risalgono in superficie, e non reagiscono agli stimoli. Per gli animali post-metamorfosi, oltre ai citati comportamenti anomali, vanno registrate le grandi differenze di consumo alimentare tra i gruppi trattati. Le malformazioni e le lesioni apparenti possono manifestarsi tra l'altro con anomalie morfologiche (ad esempio deformità dei membri), lesioni emorragiche, edema addominale e infezioni batteriche o micotiche. Le lesioni sulla testa nelle rane giovani, subito dietro le narici, possono essere indicative di livelli di umidità insufficienti. Tali determinazioni sono di natura qualitativa e sono considerate analoghe ai sintomi clinici di malattie o stress e sono il risultato di confronti con gli animali di controllo. Un tasso di tali anomalie superiore nelle vasche esposte rispetto al gruppo di controllo costituisce la prova di una tossicità evidente.

Sottocampione di larve

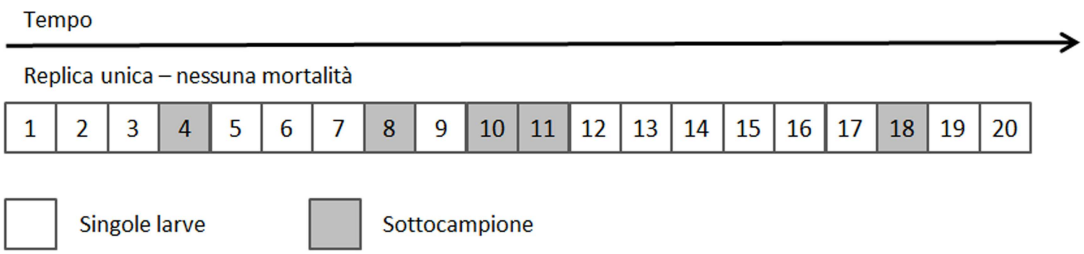
Descrizione generale della preparazione di sottocampioni di larve

40. I girini che hanno raggiunto lo stadio NF62 devono essere rimossi dalle vasche, campionati o spostati alla prossima fase dell'esposizione in una nuova vasca, oppure fisicamente separati dagli altri girini nella medesima vasca mediante un divisore. I girini sono controllati ogni giorno e viene annotato il giorno in cui ogni singolo girino raggiunge lo stadio NF62. La caratteristica distintiva nell'ambito di questa valutazione è la forma della testa. Quando la testa si è ridotta in misura tale da apparire approssimativamente della stessa larghezza del tronco del girino e gli arti anteriori hanno raggiunto il livello della metà del cuore, si considera che l'individuo ha raggiunto lo stadio NF62.

41. L'obiettivo è prelevare un campione di un totale di cinque girini allo stadio NF62 per vasca di replica. Il prelievo deve avvenire in modo assolutamente casuale, ma deve essere deciso precedentemente. La **figura 1** mostra un esempio ipotetico di vasca di replica. Se in una determinata vasca sopravvivono 20 girini quando il primo individuo raggiunge lo stadio NF62, sono selezionati cinque esemplari a caso tra 1 e 20. Il girino #1 è il primo individuo a raggiungere lo stadio NF62 e il girino #20 è l'ultimo individuo in una vasca a raggiungere lo stadio NF62. Analogamente, se vi sono 18 larve sopravvissute in una vasca, la selezione di 5 esemplari si farà a caso tra 1 e 18. La procedura va eseguita per ciascuna replica quando il prima individuo raggiunge lo stadio NF62. In caso di mortalità durante il campionamento dello stadio NF62, i campioni rimanenti devono essere nuovamente randomizzati in funzione di quante larve pre-stadio NF62 sono rimaste e di quanti altri campioni sono necessari per raggiungere un totale di cinque campioni da quella replica. Il giorno in cui un girino raggiunge lo stadio NF62, si consulta il diagramma di campionamento preparato per stabilire se tale individuo deve essere campionato o separato fisicamente dagli altri girini per continuare l'esposizione. Nell'esempio illustrato (figura 1), il primo individuo che ha raggiunto lo stadio NF62 (ad es. casella #1) è fisicamente separato dalle altre larve, prosegue l'esposizione e il giorno dello studio in cui tale esemplare raggiunge lo stadio NF62 viene annotato nella relazione. Successivamente, gli esemplari #2 e #3 sono sottoposti al medesimo trattamento del #1 e quindi l'esemplare #4 è prelevato per osservare gli indicatori di crescita e per procedere a un esame istologico della tiroide (secondo questo esempio). Questa procedura prosegue fino al momento in cui il 20 ° esemplare raggiunge gli altri esemplari che hanno superato lo stadio NF62 o è sottoposto a campionamento. La procedura random utilizzata deve garantire a tutti i girini la medesima probabilità di essere selezionati. Ciò può essere ottenuto con qualsiasi metodo di scelta casuale, ma richiede anche che ciascun girino sia stato catturato con un retino a un certo punto durante il periodo di sottocampionamento prima di raggiungere lo stadio NF62.

Figura 1

Esempio ipotetico di regime di campionamento allo stadio NF62 in una singola vasca di replica



42. Per il sottocampionamento larvale, gli endpoint ottenuti sono: 1) tempo fino allo stadio NF62 (ossia, numero di giorni tra la fecondazione e lo stadio NF62); 2) anomalie esterne; 3) morfometria (ad. es., peso e lunghezza); e 4) istologia della tiroide.

Soppressione incruenta dei girini

43. Il sottocampione di girini allo stadio NF62 (5 esemplari per replica) è soppresso immergendolo per 30 minuti in quantità appropriate (ad esempio 500 ml) di soluzione anestetica (ad esempio, soluzione a 0,3 % di MS-222, metan sulfonato di tricaina, CAS.886-86-2). La soluzione MS-222 deve essere tamponata con bicarbonato di sodio a un pH di circa 7,0, in quanto la soluzione MS-222 non tamponata è acida e irritante per la pelle della rana, causa di un limitato assorbimento e un'inutile stress supplementare per gli organismi.

44. Mediante retino, un girino è rimosso dalla vasca sperimentale e trasferito (immerso) nella soluzione anestetica. Dopo l'eliminazione incruenta eseguita correttamente, l'animale è pronto per l'autopsia quando non è più in grado di reagire agli stimoli esterni, come il pizzicamento dell'arto posteriore con un paio di pinze.

Morfometria (peso e lunghezza)

45. Le misurazioni del peso umido (al mg) e della lunghezza dall'apice del muso alla cloaca (SVL) (a 0,1 mm) di ciascun girino vanno effettuate immediatamente non appena il girino non risponde più agli stimoli sotto l'effetto dell'anestesia (figura 2a). Si può utilizzare un software di analisi delle immagini per misurare la SVL a partire da una fotografia. I girini devono essere asciugati per tamponamento prima di essere pesati in modo da rimuovere l'acqua in eccesso. Dopo la misurazione delle dimensioni del corpo (peso e SVL), si raccomanda di registrare o annotare qualsiasi alterazione morfologica grave e/o segni clinici di tossicità quali scoliosi (cfr. appendice 8), petecchie ed emorragie; si raccomanda di utilizzare uno strumento digitale per documentare le anomalie. La petecchia è una piccola emorragia puntiforme, di colore rosso o violaceo, dei capillari della pelle.

Raccolta e fissazione dei tessuti

46. Le ghiandole tiroidee del sottocampione di larve sono esaminate in vista dell'analisi istologica. La parte inferiore del torso situata dietro agli arti anteriori è rimossa ed eliminata. La carcassa dissezionata è fissata nel fissativo di Davidson. Il volume di fissativo nella vasca deve essere superiore o uguale a 10 volte il volume approssimativo dei tessuti. Il fissativo è agitato o fatto roteare in modo idoneo per fissare adeguatamente i tessuti in esame. Tutti i tessuti rimangono nel fissativo di Davidson per almeno 48 ore, ma non più di 96 ore; sono quindi sciacquati in acqua deionizzata e conservati in formalina al 10 % neutra tamponata (1) (29).

Istologia della tiroide

47. Ciascun sottocampione di larve (tessuti fissati) è sottoposto ad analisi istologica delle ghiandole della tiroide, al fine di effettuare una diagnosi e valutare l'indice di gravità (29) (30).

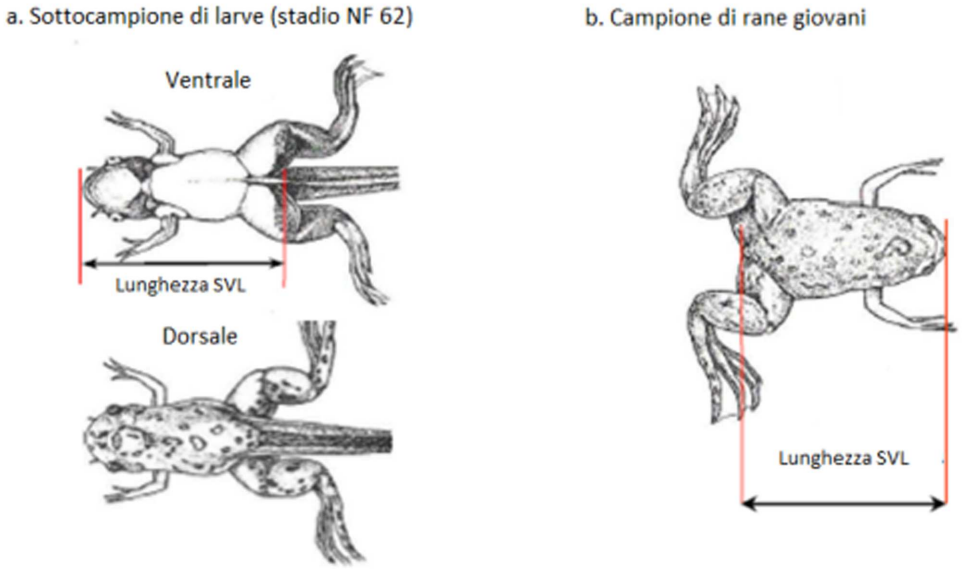


Figura 2: Parametri per la misurazione della lunghezza dall'apice del muso alla cloaca nel LAGDA nei girini allo stadio NF62 (a) e nelle rane giovani (b). Le caratteristiche distintive dello stadio NF62 (a): la testa ha la stessa larghezza del tronco, la lunghezza del nervo olfattivo è più corta del diametro del bulbo olfattivo (vista dorsale), e gli arti anteriori sono al livello del cuore (vista ventrale). Immagini adattate da Nieuwkoop e Faber (1994).

Fine dell'esposizione larvale

48. Dato il numero iniziale di girini, si prevede che vi sarà probabilmente una piccola percentuale di individui che non si sviluppano normalmente e non effettuano la metamorfosi (NF66) in un lasso di tempo ragionevole. La parte larvale dell'esposizione non deve superare i 70 giorni. I girini rimasti alla fine di questo periodo devono essere soppressi in modo non cruento (cfr. paragrafo 43); vanno misurati il peso umido e la SVL, lo stadio di sviluppo è stabilito secondo il metodo di Nieuwkoop e Faber, 1994, e le eventuali anomalie di sviluppo sono registrate.

Eliminazione dopo lo stadio NF66

49. Dieci individui per vasca sono conservati a partire dallo stadio NF66 (riassorbimento totale della coda) fino al completamento dell'esposizione. Pertanto, dopo che tutti gli animali hanno raggiunto lo stadio NF66 o 70 giorni (a seconda di quale condizione si verifica prima), è opportuno procedere alla loro eliminazione. Gli animali che hanno raggiunto lo stadio di sviluppo NF66, ma che non saranno conservati per continuare l'esposizione sono scelti a caso.

50. Gli animali non selezionati per continuare l'esposizione sono soppressi in modo incruento (cfr. paragrafo 43). Lo stadio di sviluppo, il peso umido e la SVL (figura 2b) sono misurati e ciascun animale è sottoposto a necroscopia macroscopica. Il sesso fenotipico (in base alla morfologia delle gonadi) è registrato come femmina, maschio o indeterminato.

Campioni di rane giovani

Descrizione generale della preparazione di campioni di rane giovani

51. Gli animali restanti continuano ad essere esposti fino a 10 settimane dopo il tempo mediano fino allo stadio NF66 nel controllo contenente l'acqua di diluizione (e/o del controllo con solvente, se del caso). Alla fine del periodo di esposizione, i rimanenti animali (massimo 10 rane per replica) sono soppressi in modo incruento e i vari endpoint sono misurati o valutati e registrati: 1) morfometria (peso e lunghezza); 2) rapporti numerici tra i sessi fenotipici/genotipici; 3) peso del fegato (indice epato-somatico); 4) esame istopatologico (gonadi, dotti riproduttivi, fegato e reni) e, facoltativamente, 5) VTG nel plasma.

Soppressione incruenta delle rane

52. I campioni di rane allo stadio giovanile (post-metamorfosi), sono soppressi con un'iniezione intraperitoneale di anestetico, ad esempio 10 % MS-222 in una idonea soluzione tamponata di fosfato. Le rane possono essere prelevate quando non reagiscono più agli stimoli (in genere circa 2 minuti dopo l'iniezione, se si usa il 10 % di MS-222 in un dosaggio di 0,01 ml per g di rana). Sebbene le rane allo stadio giovanile possano essere immerse in una concentrazione più elevata di anestetico (MS-222), l'esperienza ha dimostrato che questo metodo richiede più tempo e che tale durata può non essere adeguata per il campionamento. L'iniezione permette di sopprimere gli animali in modo incruento, efficiente e rapido prima del campionamento, che non deve essere avviato fino a quando non sia stata confermata la mancanza di reattività delle rane per assicurarsi che gli animali siano effettivamente morti. Se le rane presentano segni di manifesta sofferenza (cioè elevatissime sofferenze e probabile morte) o sono moribonde, gli animali devono essere anestetizzati e soppressi in modo incruento e trattati come casi di mortalità ai fini dell'analisi dei dati. Se una rana viene soppressa per morbilità, ciò viene annotato nella relazione sulla prova. A seconda del momento durante la prova in cui la rana è soppressa, l'animale può essere conservato per l'analisi istopatologica (mantenendolo in fissativo per un'eventuale esame istopatologico).

Morfometria (peso e lunghezza)

53. Le misurazioni del peso umido e della SVL (figura 2b) sono identiche a quelle descritte per il sottocampione di larve.

VTG nel plasma (facoltativo)

54. La VTG è un biomarcatore comunemente accettato, derivante dall'esposizione a sostanze chimiche estrogeniche. Per il LAGDA, la VTG del plasma può essere facoltativamente misurata all'interno dei campioni di rane giovani (ciò può essere particolarmente rilevante se si sospetta che la sostanza chimica in esame sia un estrogeno).

55. Gli arti posteriori delle rane giovani soppresse sono sezionati e il sangue raccolto con un tubo capillare eparinato (anche se metodi alternativi di raccolta del sangue, come la puntura cardiaca, possono essere adatti). Il sangue è espulso in una provetta da microcentrifuga (ad esempio di 1,5 ml di volume) e centrifugato per ottenere il plasma. I campioni di plasma devono essere conservati a una temperatura pari o inferiore a -70 °C fino alla misurazione della VTG. La concentrazione di VTG nel plasma può essere misurata mediante una prova di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) (appendice 6) o un metodo alternativo, ad esempio la spettrometria di massa (31). Gli anticorpi specifici della specie sono preferibili a motivo della loro maggiore sensibilità.

Determinazione del sesso genetico

56. Il sesso genotipico di ogni rana giovane è valutato in base ai marcatori sviluppati da Yoshimoto *et al*. Per determinare il sesso genotipico, una porzione (o la totalità) di un arto posteriore (o di qualsiasi altro tessuto) è prelevato durante la dissezione e conservato in una provetta da microcentrifuga (i campioni di tessuto possono essere prelevati da qualsiasi tessuto). Il tessuto può essere conservato a una temperatura pari o inferiore a -20 °C fino all'isolamento dell'acido desossiribonucleico (DNA). L'isolamento del DNA da tessuti può essere effettuato con kit disponibili in commercio e la presenza o l'assenza del marcatore è analizzata con il metodo della reazione a catena della polimerasi (PCR) (appendice 5). In genere, la concordanza tra sesso istologico e genotipo negli animali di controllo al momento del campionamento delle rane allo stadio giovanile del gruppo di controllo è superiore al 95 %.

Raccolta e fissazione dei tessuti per l'istopatologia

57. Le gonadi, i dotti di riproduzione, i reni e i fegati sono raccolti per l'esame istologico durante il campionamento finale. La cavità addominale è aperta e il fegato dissezionato e pesato. Successivamente, gli organi digestivi (ad. es. stomaco, intestini) sono rimossi con cura dalla parte inferiore dell'addome per far apparire le gonadi, i reni e i dotti di riproduzione. Va presa nota di qualsiasi anomalia morfologica grossolana delle gonadi. Infine, sono rimossi gli arti posteriori se non sono già stati precedentemente rimossi per la raccolta del sangue. I fegati raccolti e la carcassa con le gonadi conservate *in situ* sono collocati immediatamente nel fissativo di Davidson. Il volume di fissativo nel contenitore deve essere superiore o uguale a 10 volte il volume approssimativo dei tessuti. Tutti i tessuti rimangono nel fissativo di Davidson per almeno 48 ore, ma non più di 96 ore; sono quindi sciacquati in acqua deionizzata e conservati in formalina al 10 % neutra tamponata (1) (29).

Esame istopatologico

58. Ciascun campione di rana giovane è sottoposto ad analisi istologica per individuare patologie nelle gonadi, nei dotti di riproduzione, nei reni e nei tessuti epatici (32). Anche il fenotipo delle gonadi è osservato in tale valutazione (ad esempio, ovaie, testicoli, ermafrodismo); insieme alla caratterizzazione del sesso genotipico di ciascun individuo, le osservazioni possono servire per calcolare rapporti numerici tra sessi fenotipici/genotipici.

DATI E RELAZIONI

Analisi statistica

59. Il LAGDA genera tre tipologie di dati che vanno analizzati statisticamente: 1) dati quantitativi continui (peso, SVL, LSI, VTG); 2) dati relativi ai tempi che precedono le varie manifestazioni concernenti i ritmi di sviluppo (ad es., giorni fino al raggiungimento dello stadio NF62 a partire dall'avvio della prova); e 3) dati ordinali sotto forma di indici di gravità relativi o di stadi di sviluppo, derivanti dalle valutazioni istopatologiche.

60. Se si deve determinare la NOEC o la EC_x, si raccomanda che il disegno sperimentale e la prova statistica prescelta abbiano una potenza tale da consentire di individuare i cambiamenti d'importanza biologica negli endpoint. È preferibile effettuare le analisi statistiche dei dati (generalmente, sulla base della media delle repliche) seguendo le procedure descritte nel documento intitolato *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity data*: *A Guidance to Application* (33). L'appendice 7 del presente metodo di prova illustra l'albero delle decisioni raccomandato per l'analisi statistica e dà indicazioni per il trattamento dei dati e per la scelta del test o modello statistico più appropriato da utilizzare nel LAGDA.

61. I dati ottenuti dai campioni di rane giovani (ad esempio, crescita, LSI) sono analizzati separatamente per ciascun sesso genotipico, poiché il sesso genotipico è determinato per tutte le rane.

Considerazioni relative all'analisi dei dati

Utilizzo di repliche e di trattamenti compromessi

62. Repliche e trattamenti possono essere compromessi a causa della mortalità eccessiva dovuta a tossicità evidente, malattia o errore tecnico. Se un trattamento è compromesso da malattia o errore tecnico, tre trattamenti non compromessi e tre repliche non compromesse devono essere disponibili per l'analisi. Se una tossicità evidente si manifesta nel o nei trattamenti più forti, è preferibile che almeno tre livelli di trattamento con tre repliche non compromesse siano disponibili per l'analisi [conformemente all'approccio della concentrazione massima tollerata applicato nelle linee guida dell'OCSE per i metodi di prova (34)]. Oltre alla mortalità, i segni di tossicità manifesta possono includere effetti comportamentali (ad esempio animali galleggianti sulla superficie, che giacciono sul fondo della vasca, nuotano in modo irregolare o in direzione inversa, non salgono in superficie), lesioni morfologiche (ad esempio lesioni emorragiche, edema addominale) o inibizione delle reazioni alimentari normali se paragonate agli animali di controllo sotto il profilo qualitativo.

Controllo con solvente

63. Al completamento della prova, vanno valutati i potenziali effetti del solvente (se utilizzato), mediante un confronto statistico tra il gruppo di controllo con solvente e il gruppo di controllo con acqua di diluizione. I principali parametri da valutare in questo contesto sono gli indicatori di crescita (peso e lunghezza), poiché essi sono sensibili alla tossicità generale. Se tra i gruppi di controllo contenente acqua di diluizione e i gruppi di controllo con solvente vengono rilevate differenze statisticamente significative, si dovrebbe ricorrere al giudizio professionale di un esperto per stabilire se la validità della prova è compromessa. Se i due controlli differiscono, i controlli esposti alla sostanza chimica devono essere confrontati con il controllo con solvente, a meno che non sia noto che è preferibile effettuare il confronto con il controllo contenente acqua di diluizione. Se non vi sono differenze statisticamente significative tra i due gruppi di controllo, si raccomanda di confrontare i controlli esposti alla sostanza chimica in esame con i due gruppi di controllo (solvente e acqua di diluizione), a meno che non sia noto che è preferibile effettuare il confronto con il solo gruppo di controllo contenente l'acqua di diluizione o con il solo gruppo di controllo contenente il solvente.

Relazione sulla prova

64. I seguenti dati devono figurare nella relazione sulla prova:

Sostanza chimica in esame

— natura fisica e, se del caso, proprietà fisicochimiche

— Sostanza monocostituente:

aspetto fisico, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche;

identificazione chimica, come la denominazione IUPAC o CAS, il numero CAS, il codice SMILES o InChI, la formula strutturale, l'identità chimica o le impurezze, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc. (incluso il tenore di carbonio organico, se opportuno).

— Sostanza multicostituente, UVCB e miscele:

caratterizzata nella massima misura possibile mediante identità chimica (cfr. sopra), la presenza quantitativa e le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti.

Specie sperimentale:

— nome scientifico, ceppo, se disponibile, origine e metodo di raccolta delle uova fecondate e successiva manipolazione.

— Incidenza della scoliosi nei controlli storici della coltura madre utilizzata.

Condizioni sperimentali:

— fotoperiodo/i;

— disegno sperimentale (ad esempio, dimensioni della vasca di prova, materiale e volume d'acqua, numero di vasche di prova e repliche, numero di organismi di prova per replica);

— metodo di preparazione delle soluzioni madre e frequenza di rinnovo (indicare l'agente solubilizzante, se usato, e la sua concentrazione);

— metodo di dosaggio della sostanza chimica in esame (ad esempio pompe dosatrici, sistemi di diluizione);

— efficienza di recupero del metodo e concentrazioni nominali di prova, limite di quantificazione, medie dei valori misurati, rispettive deviazioni standard nelle vasche di prova, metodo con cui tali deviazioni e medie sono state ottenute così come dati comprovanti che le misurazioni corrispondono alle concentrazioni della sostanza chimica in esame in soluzione vera;

— caratteristiche dell'acqua di diluizione: pH, durezza, temperatura, concentrazione dell'ossigeno disciolto, livelli di cloro residuo (se misurati), iodio totale, carbonio organico totale (idem), solidi in sospensione (idem), salinità del mezzo di prova (idem) e altre eventuali misurazioni eseguite;

— concentrazioni nominali di prova, medie dei valori misurati e loro deviazioni standard;

— qualità dell'acqua nelle vasche sperimentali: pH, temperatura (giornaliera) e concentrazione di ossigeno disciolto;

— informazioni dettagliate sul regime alimentare (ad esempio tipo di cibo, origine, quantità somministrata e frequenza).

Risultati:

— Dati comprovanti il fatto che i controlli hanno soddisfatto i criteri di validità;

— dati relativi al gruppo di controllo (più il controllo con solvente se utilizzato) e i gruppi trattati come segue: mortalità e anomalie osservate, tempo fino allo stadio NF62, esame istologico della tiroide (solo campione di larve), crescita (solo peso e lunghezza), LSI (solo campione di rane giovani), rapporti numerici tra i sessi fenotipici/genotipici (solo campione di rane giovani), risultati dell'esame istopatologico delle gonadi, dei dotti riproduttivi, dei reni e del fegato (solo campione di rane giovani) e la VTG nel plasma (se misurata, solo campione di rane giovani);

— approccio seguito per l'analisi statistica e per il trattamento dei dati (test o modello statistico utilizzato);

— concentrazione senza effetti osservati (NOEC) per ogni risposta valutata;

— concentrazione minima alla quale si osserva un effetto (LOEC) per ogni risposta valutata (a $\alpha = 0{,}05$); EC_x per ogni risposta valutata, se del caso, e intervalli di confidenza (95 %, ad esempio), grafico del modello adattato utilizzato per calcolarla, pendenza della curva concentrazione-risposta, formula del modello di regressione, stima dei parametri del modello e dei rispettivi errori standard.

— Eventuali deviazioni dal metodo di prova e dai criteri di accettazione e considerazioni relative alle potenziali conseguenze sui risultati della prova.

65. Per i risultati delle misurazioni degli endpoint, vanno presentati i valori medi e le rispettive deviazioni standard (se possibile, per replica e per concentrazione).

66. Il tempo mediano verso lo stadio NF62 nei controlli è calcolato e presentato come media delle mediane delle repliche e della loro deviazione standard. Analogamente, per i trattamenti è necessario calcolare una mediana del trattamento presentandola come media delle mediane delle repliche e della loro deviazione standard.

BIBLIOGRAFIA

(1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.

(2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.

(4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1 130: 16-27.

(5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140-144.

(6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1 565.

(7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281-285.

(8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.

(9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.

(10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143-150.

(11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2 469-2 474.

(12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

(13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441-448.

(14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321-327.

(15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159-169.

(16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.

(17) Capitolo C.4 del presente allegato, Determinazione della pronta biodegradabilità.

(18) Capitolo C.29 del presente allegato, Pronta biodegradabilità — CO_2 in recipienti ermetici.

(19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539-551.

(20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593-9.

(21) OECD (2000). OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69-92.

(23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.

(24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.

(25) Capitolo C.38 del presente allegato, Prova sulla metamorfosi degli anfibi.

(26) Capitolo C.48 del presente allegato, Saggio di tossicità a breve termine sulla riproduzione di pesci.

(27) Capitolo C.41 del presente allegato, Prova sullo sviluppo sessuale dei pesci.

(28) Capitolo C.49 del presente allegato — Prova di tossicità acuta sugli embrioni di pesci.

(29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology.Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.

(31) Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.

(32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

Appendice 1

DEFINIZIONI

Endpoint apicale: indicatore di effetti a livello della popolazione.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

ELISA: (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) prova di immunoassorbimento enzimatico

EC_x: (concentrazione con effetto dell'x %) la concentrazione che provoca un effetto nell'x % degli organismi di prova durante un determinato periodo di esposizione rispetto al controllo. Ad esempio, EC_{50} è la concentrazione che si ritiene produca un effetto su un endpoint in esame nel 50 % della popolazione esposta durante il periodo di esposizione definito.

dpf: (*days post fertilization*) giorni dopo la fecondazione.

Prova a flusso continuo: prova nella quale le soluzioni testate scorrono nel sistema sperimentale con un flusso continuo durante il periodo di esposizione.

HPG (*Hypothalamic-pituitary-gonadal*) Axis: asse ipotalamo-ipofisi-gonadi

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry* — Unione internazionale di chimica pura e applicata.

Concentrazione minima alla quale si osserva un effetto (LOEC — *Lowest Observed Effect Concentration*): concentrazione più bassa testata della sostanza chimica in esame alla quale si osserva un effetto significativo ($p < 0,05$) rispetto al controllo. Tutte le concentrazioni di prova superiori alla LOEC, tuttavia, devono avere un effetto dannoso uguale o superiore a quello osservato per la LOEC. Quando queste due condizioni non possono essere soddisfatte, occorre fornire una spiegazione dettagliata per spiegare come è stata scelta la LOEC (e di conseguenza la NOEC). L'appendice 7 fornisce orientamenti al riguardo.

Concentrazione letale mediana (LC_{50}): concentrazione della sostanza chimica in esame ritenuta letale per il 50 % degli organismi esposti nell'arco temporale della prova.

Concentrazione senza effetti osservati (NOEC): concentrazione di prova immediatamente inferiore alla LOEC, alla quale non vengono osservati effetti statisticamente significativi ($p < 0,05$) rispetto al controllo durante il periodo di esposizione definito.

SMILES: *Simplified Molecular Input Line Entry Specification* (notazione semplificata lineare delle molecole).

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata seguendo il presente metodo di prova.

UVCB: sostanze la cui composizione non è conosciuta o è variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali origine biologica.

VTG: la vitellogenina è una lipo-glico-fosfo-proteina precursore delle proteine del tuorlo normalmente prodotta dalle femmine sessualmente attive di tutte le specie ovipare.

Appendice 2

ALCUNE CARATTERISTICHE CHIMICHE DI UN'ACQUA DI DILUIZIONE DI QUALITÀ ACCETTABILE

Sostanza	Concentrazione limite
Particolato	5 mg/l
Carbonio organico totale	2 mg/l
Ammoniaca non ionizzata	1 µg/l
Cloro residuo	10 µg/l
Pesticidi organofosforati totali	50 ng/l
Pesticidi organoclorurati totali più difenili policlorurati	50 ng/l
Cloro organico totale	25 ng/l
Alluminio	1 µg/l
Arsenico	1 µg/l
Cromo	1 µg/l
Cobalto	1 µg/l
Rame	1 µg/l
Ferro	1 µg/l
piombo	1 µg/l
Nichel	1 µg/l
Zinco	1 µg/l
Cadmio	100 ng/l
Mercurio	100 ng/l
Argento	100 ng/l

Appendice 3

CONDIZIONI SPERIMENTALI PER IL LAGDA

1.	Specie sperimentale	*Xenopus laevis*
2.	Tipo di prova	Flusso continuo
3.	Temperatura dell'acqua	La temperatura nominale è di 21 °C. La temperatura media durante la prova è di 21 ± 1 °C (i differenziali inter-repliche e inter-trattamenti non devono superare 1,0 °C)
4.	Qualità dell'illuminazione	Lampade fluorescenti (ad ampio spettro) 600-2000 lux (lumen/m^2) sulla superficie dell'acqua
5.	Fotoperiodo	12 ore di luce, 12 ore di buio
6.	Volume della soluzione di prova e vasca di prova (vasca)	4-10 l (profondità minima dell'acqua 10-15 cm) Vasca di vetro o di acciaio inossidabile
7.	Rinnovo delle soluzioni di prova, in volume	Costante, in considerazione sia del mantenimento delle condizioni biologiche che dell'esposizione chimica (ad esempio, rinnovo del volume di 5 vasche al giorno)
8.	Età degli organismi sperimentali all'avvio della prova	Stadio 8-10 secondo Nieuwkoop e Faber (NF)
9.	Numero di organismi per replica	20 animali (embrioni)/ vasca (replica) all'inizio dell'esposizione e 10 animali (rane allo stadio giovanile)/ vasca (replica) dopo lo stadio NF66 fino al completamento dell'esposizione
10.	Numero di trattamenti	Minimo 4 trattamenti per la sostanza chimica in esame più controlli appropriati
11.	Numero di repliche per trattamento	4 repliche per trattamento per la sostanza chimica in esame e 8 repliche per il o i controlli
12.	Numero di organismi per concentrazione di prova	Minimo 80 animali per trattamento per la sostanza chimica in esame e minimo 160 animali per il o i controlli
13.	Acqua di diluizione	Qualsiasi acqua che consenta la crescita e lo sviluppo normali di *X. laevis* (ad esempio, acqua di sorgente o acqua di rubinetto filtrata con carbone)
14.	Aerazione	Non è obbligatoria, ma l'aerazione delle vasche può essere necessaria se i livelli di ossigeno disciolto scendono al di sotto dei limiti raccomandati e se il flusso della soluzione di prova è portato al massimo.
15.	Ossigeno disciolto della soluzione di prova	Ossigeno disciolto: ≥ 40 % del valore di saturazione dell'aria o ≥ 3,5 mg/l

16. pH della soluzione di prova	6.5-8.5 (i differenziali inter-replica e inter-trattamenti non devono superare 0,5).
17. Durezza e alcalinità della soluzione di prova	10-250 mg $CaCO_3$/l
18. Regime alimentare	(Cfr. appendice 4).
19. Periodo d'esposizione	Dallo stadio NF8-10 fino a dieci settimane dopo il tempo mediano verso lo stadio NF62 nel gruppo di controllo contenente l'acqua di diluizione e/o il solvente (massimo 17 settimane)
20. Endpoint biologici	Mortalità (e anomalie morfologiche), tempo verso lo stadio NF62 (campione di larve), istologia della tiroide (campione di larve), crescita (peso e lunghezza), indice epatico-somatico (campione di rane giovani), rapporti numerici tra i sessi genotipici/fenotipici (campione di rane giovani), istopatologia delle gonadi, dei dotti di riproduzione, dei reni e del fegato (campione di rane giovani) e della vitellogenina nel plasma (campione di rane giovani) (facoltativo).
21. Criteri di validità della prova	L'ossigeno disciolto è > 40 % del valore di saturazione dell'aria; la temperatura media dell'acqua si situa nell'intervallo di 21 ± 1 °C e i differenziali inter-repliche e inter-trattamenti sono < 1,0 °C; il pH della soluzione di prova è compreso tra 6,5 e 8,5; la mortalità nei controlli è ≤ 20 % in ciascuna replica e il tempo medio verso lo stadio NF62 nel controllo è ≤ 45 giorni; il peso medio degli organismi di prova nello stadio NF62 e al completamento della prova nei controlli e nei controlli con solvente (se utilizzati) raggiunge rispettivamente 1,0 ± 0,2 e 11,5 ± 3 g.; i dati disponibili dimostrano che le concentrazioni della sostanza chimica in esame in soluzione sono state mantenute in modo soddisfacente entro un intervallo del ± 20 % dei valori misurati medi.

Appendice 4

REGIME ALIMENTARE

Giova osservare che, sebbene il presente regime alimentare sia raccomandato, si possono prevedere alternative a condizione che gli organismi di prova crescano e si sviluppino a un ritmo adeguato.

Alimentazione delle larve

Preparazione del mangime da somministrare alle larve

A. 1:1 (v/v) Trout Starter: algae/TetraFin® (o equivalente);

1. Trout Starter: miscelare 50 g di Trout Starter (granuli fini o polvere) e 300 ml di acqua filtrata adeguata in un miscelatore ad alta velocità per 20 secondi

2. miscela Algae/TetraFin® (o equivalente): miscelare 12 g di dischi di spirulina con 500 ml di acqua filtrata in un miscelatore ad alta velocità per 40 secondi, miscelare 12 g di Tedrain® (o equivalente) con 500 ml di acqua filtrata e poi mescolare il tutto fino ad ottenere 1 l di 12 g/l di dischi di spirulina con 12 g/litro di Tetrafin® (o equivalente).

3. Mescolare uguali volumi della miscela di Trout Starter e della miscela di alghe/TetraFin ® (o equivalente)

B. Artemie:

Far schiudere 15 ml di uova di artemia in 1 l di acqua salata (preparato aggiungendo 20 ml di NaCl a 1 l di acqua deionizzata). Dopo aver aerato per 24 ore a temperatura ambiente a luce costante, si procede alla raccolta delle artemie. In sintesi, l'arresto dell'aerazione permette alle artemie di depositarsi in 30 min. Le cisti che galleggiano sulla superficie della vasca sono ritirate e eliminate, quindi le artemie sono filtrate adeguatamente e immerse in 30 ml di acqua filtrata.

Protocollo di alimentazione

La tabella 1 contiene un riferimento al tipo e alla quantità di mangime somministrato alle larve durante l'esposizione. Gli animali devono essere alimentati tre volte al giorno dal lunedì al venerdì e una volta al giorno durante il fine settimana.

Tabella 1

Regime alimentare per le larve di *X. laevis* nelle condizioni di flusso continuo

Tempo (*) (post fecondazione)	Trout Starter: algae/TetraFin® (o equivalente)		Artemie	
	Giorno infrasettimanale (3 volte al giorno)	Weekend (1 volta al giorno)	Giorno infrasettimanale (2 volte al giorno)	Weekend (1 volta al giorno)
Giorni 4-14 (nelle settimane 0-1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (nei giorni 8-15) 1 ml (dal giorno 16)	0,5 ml (nei giorni 8-15) 1 ml (dal giorno 16)
Settimana 2	0,67 ml	2,4 ml		
Settimana 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Settimana 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml

Tempo (*) (post fecondazione)	Trout Starter: algae/TetraFin® (o equivalente)		Artemie	
	Giorno infrasettimanale (3 volte al giorno)	Weekend (1 volta al giorno)	Giorno infrasettimanale (2 volte al giorno)	Weekend (1 volta al giorno)
Settimana 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
Settimana 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Settimana 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Settimane 8-10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) Il giorno 0 corrisponde al giorno dell'iniezione di hCG.

Variazione di regime alimentare tra lo stadio larvale e lo stadio giovanile

Quando hanno completato la metamorfosi, le larve transitano verso il regime alimentare per le rane giovani, descritto di seguito. Durante tale transizione, le razioni alimentari somministrate alle larve sono ridotte proporzionalmente all'incremento delle razioni somministrate alle rane giovani in ciascun gruppo di cinque girini che hanno superato lo stadio NF62 e si avvicinano al completamento della metamorfosi (stadio NF66).

Alimentazione delle rane giovani

Regime alimentare degli esemplari allo stadio giovanile

Una volta completata la metamorfosi (stadio NF66), il regime di alimentazione cambia: sono somministrati solo mangimi di prima scelta di tipo 3/32 pollici (Xenopus Express™, FL, USA), o equivalenti.

Preparazione di granulati per la transizione dallo stadio larvale a quello giovanile

Il mangime in granuli per anfibi è macinato brevemente in un macinacaffè, in un mixer o con mortaio e pestello, in modo da ridurre la dimensione dei granuli di circa 1/3. Si sconsiglia una macinazione troppo lunga, che trasformerebbe il granulato in polvere.

Protocollo alimentare

La **tabella 2** contiene un riferimento al tipo e alla quantità di mangime somministrato durante lo stadio giovanile e lo stadio adulto. Gli animali vanno nutriti una volta al giorno. Si noti che, nel corso della metamorfosi, gli animali continuano a ricevere una razione di artemidi fino a che > 95 % degli animali hanno completato la metamorfosi.

Gli animali non devono essere nutriti il giorno del completamento della prova in modo da non falsare il risultato delle misurazioni del peso.

Tabella 2

Regime alimentare per le rane giovani di *X. laevis* nelle condizioni di flusso continuo. Si noti che gli animali non metamorfizzati, compresi quelli la cui metamorfosi è stata ritardata dal trattamento chimico, non possono mangiare granuli non macinati

Tempo (*) (Settimane che seguono la data mediana della metamorfosi)	Mangime macinato (mg per ranocchietto)	Mangime intero (mg per ranocchietto)
Durante la metamorfosi degli animali	25	0
Settimane 0-1	25	28
Settimane 2-3	0	110
Settimane 4-5	0	165
Settimane 6-9	0	220

(*) Il primo giorno della settimana 0 corrisponde alla data mediana di metamorfosi degli animali di controllo.

Appendice 5

Determinazione del Sesso Genotipico

Il metodo di determinazione del sesso genotipico nella specie *Xenopus laevis* si basa su Yoshimoto *et al.*, 2008. Le procedure dettagliate di genotipizzazione possono essere ottenute da tale pubblicazione, se necessario. Si possono utilizzare metodi alternativi (ad esempio PCR quantitativa in modalità *high-throughput*).

Primer di X. *laevis*

Marcatore DM-W

Senso: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Antisenso: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Controllo positivo

Senso: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Antisenso: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Purificazione del DNA

Purificare il DNA dal tessuto muscolare o cutaneo, usando ad esempio il Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (cat # 69 506) o prodotto simile secondo le istruzioni del kit. Il DNA può essere eluito mediante colonnine da centrifuga utilizzando meno tampone per ottenere campioni più concentrati, se ritenuto necessario per la PCR. Si noti che il DNA è piuttosto stabile, pertanto si deve fare attenzione ad evitare contaminazioni incrociate che potrebbero causare un'erronea caratterizzazione di maschi come femmine, o viceversa.

PCR

Nella tabella 1 è riportato un protocollo di campionamento con il metodo JumpStart™ *Taq* di Sigma.

Tabella 1

Protocollo di campionamento con il metodo JumpStart™ *Taq* di Sigma

Master Mix	1x (µl)	[finale]
NFW ([1])	11	-
Tampone 10x	2,0	-
$MgCl_2$ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP (10 mM ciascuno)	0,4	200 µM
Marcatore per il primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Marcatore per il primer antisenso (8 µM)	0,8	0,3 µM
Controllo per il primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Controllo per il primer antisenso (8 µM)	0,8	0,3 µM

Master Mix	1x (µl)	[finale]
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 unità/µl
Matrice di DNA	1,0	~200 pg/µl

([1]) Nuclease-free water (acqua priva di nucleasi)Nota: Al momento della preparazione del Master Mix, preparare una quantità di miscela supplementare per tener conto di eventuali perdite durante il pipettaggio (ad esempio: utilizzare 25x solo per 24 reazioni).

Reazione:

Master Mix	19.0 µl
Modello	1.0 µl
Totale	20.0 µl

Profilo del termociclatore:

Fase 1.	94 °C	1 min
Fase 2.	94 °C	30 secondi
Fase 3.	60 °C	30 secondi
Fase 4.	72 °C	1 min
Fase 5.	Passare alla fase 2.	35 cicli
Fase 6.	72 °C	1 min
Fase 7.	mantenere a 4 °C.	

I prodotti della PCR possono essere collocati immediatamente in gel o conservati a 4 °C.

Elettroforesi su gel di agarosio (3 %) (protocollo per il campione)

50X TAE

Tris	24,2 g
Acido acetico glaciale	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Aggiungere acqua fino a 100 ml

1X TAE

H_2O	392 ml
50X TAE	8 ml

3:1 Agarosio

3 parti di agarosio NuSieve™ GTG™

1 parte di agarosio di Fisher a debole elettroendosmosi (EEO)

Metodo

1. Preparare un gel al 3 % aggiungendo 1,2 g di miscela d'agarosio a 43 ml di TAE 1X. Agitare fino a disgregare le agglutinazioni.

2. Scaldare la miscela di agarosio al microonde fino a dissoluzione completa (evitando il punto di ebollizione). Lasciar raffreddare leggermente.

3. Aggiungere 1,0 µl di bromuro di etidio (10 mg/ml). Agitare il flacone. Si noti che il bromuro di etidio è mutageno, pertanto è possibile utilizzare sostanze chimiche alternative, nella misura in cui ciò sia tecnicamente possibile, per ridurre al minimo i rischi per la salute dei lavoratori ([1]).

4. Colare il gel nello stampo con il pettine. Raffreddare completamente.

5. Aggiungere il gel all'apparecchiatura. Ricoprire il gel di TAE 1X.

6. Aggiungere 1 µl di 6x colorante di dissociazione a ciascun volume di 10 µl di prodotto PCR.

7. Trasferire mediante pipetta i campioni nei pozzetti.

8. Effettuare l'elettroforesi a 160 volt costanti per ~ 20 minuti.

La figura 1 presenta un'immagine di gel di agarosio che mostra i profili di bande indicativi di un individuo di sesso maschile e uno di sesso femminile.

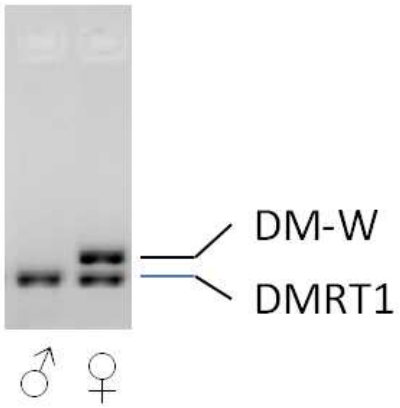


Figura 1: Immagine in gel di agarosio che mostra il profilo di banda indicativo di un individuo di sesso maschile (♂) (una banda a ~203 bp: DMRT1) e di un individuo di sesso femminile (♀) (due bande a ~259 bp: DM-W e 203 bp:DMRT1).

BIBLIOGRAFIA

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2 469-2 474.

([1]) A norma dell'articolo 4, paragrafo 1, della direttiva 2004/37/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, sulla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti cancerogeni o mutageni durante il lavoro (sesta direttiva particolare ai sensi dell'articolo 16, paragrafo 1, della direttiva 89/391/CEE del Consiglio) (GU L 158 del 30.4.2004, pag. 50).

Appendice 6

Misurazione Della Vitellogenina

La misurazione della vitellogenina (VTG) è effettuata mediante una prova di immunoassorbimento enzimatico (ELISA), originariamente elaborato per la VTG dei ciprinidi (Parks *et al*., 1999). Attualmente non esistono anticorpi in commercio per *X. laevis*. Tuttavia, data l'abbondanza di informazioni relative a questa proteina e la disponibilità di servizi commerciali di produzione di anticorpi con un buon rapporto costo/qualità, è ragionevole supporre che i laboratori possano sviluppare facilmente un test ELISA per effettuare questa misurazione (Olmstead *et al*., 2009). Anche Olmstead *et al*. (2009) forniscono una descrizione della prova, modificata per la VTG di *X. tropicalis*, come indicato di seguito. Il metodo utilizza un anticorpo prodotto in reazione alla VTG di *X. tropicalis*, ma è noto che esso funziona anche per la VTG della specie *X. laevis*. Giova osservare che possono essere utilizzati anche test ELISA non competitivi e che questi possono avere limiti di rilevamento inferiori rispetto al metodo descritto di seguito.

Materiali e reagenti

— Siero contenente l'anticorpo primario preassorbito

— Mescolare 1 parte di siero contenente l'anticorpo primario anti-VTG della *X. tropicalis* con 2 parti di plasma di maschio prelevato dal gruppo di controllo e lasciar riposare a temperatura ambiente per ~ 75 minuti, porre in ghiaccio per 30 min, centrifugare a > 20K x G per 1 ora a 4 °C, eliminare il supernatante, aliquotare, conservare a -20 °C.

— Anticorpo secondario

— Coniugato IgG di capra anti-coniglio / HRP (ad es., Bio-Rad 172 -1019)

— Standard di VTG

— VTG purificata di *X. laevis* a 3,3 mg/ml.

— TMB (3,3', 5,5' tetrametil benzidina) (ad es., KPL 50-76-00; o Sigma T0440)

— Siero di capra (NGS)(e.g., Chemicon® S26-100ml)

— piastre da microtitolazione a 96 pozzetti in polistirene EIA (ad es., ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher:07-200-35)

— Forno di ibridazione a 37 °C (o incubatore ad aria a rapido riequilibrio) per piastre, bagnomaria per provette

— Altre attrezzature, sostanze chimiche e materiali comunemente utilizzati in laboratorio.

Ricette

Tampone di rivestimento (50 mM di tampone carbonato, pH 9.6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
Acqua	428 ml

PBS 10X (0,1 M di fosfato, 1,5 M di NaCl):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
Acqua	810 ml

Tampone di lavaggio (PBST):

PBS 10X	100 ml
Acqua	900 ml

Regolare il pH a 7,3 con 1 M di HCl, poi aggiungere 0,5 ml di Tween-20

Tampone di prova:

Siero di capra (NGS)	3,75 ml
Tampone di lavaggio:	146,25 ml

Prelievo dei campioni

Il sangue è raccolto mediante un tubo capillare per ematocrito eparinato e riposto nel ghiaccio. Dopo centrifugazione per 3 minuti, il tubo è etichettato, aperto e il plasma espulso in provette da microcentrifuga da 0,6 ml contenenti 0,13 unità di aprotinina liofilizzata. (Queste provette sono preparate in anticipo mediante aggiunta della quantità adeguata di aprotinina, congelamento e liofilizzazione in una centrifuga sotto vuoto a bassa temperatura fino ad essiccamento). Conservare il plasma a -80 °C fino all'analisi.

Procedura per una piastra

Rivestimento della piastra

Mescolare 20 µl di VTG purificata con 22 ml di tampone carbonato (3 µg/ml). Versare 200 µl della miscela in ciascun pozzetto di una piastra a 96 pozzetti. Ricoprire la piastra con pellicola sigillante adesiva e lasciar incubare a temperatura di 37 °C per 2 ore (o 4 °C per una notte).

Bloccare la piastra

La soluzione bloccante è preparata aggiungendo 2 ml di siero di capra (NGS) a 38 ml di tampone carbonato. Rimuovere la soluzione bloccante e asciugare agitando. Aggiungere 350 µl di soluzione bloccante in ciascun pozzetto. Ricoprire con pellicola sigillante adesiva e incubare a temperatura di 37 °C per 2 ore (o 4 °C per una notte).

Preparazione degli standard

Mescolare 5,8 µl di standard di VTG purificata con 1,5 ml di tampone di prova in una provetta di vetro monouso borosilicato (12 x 75 mm). Ciò consente di ottenere 12 760 ng/ml di soluzione. Preparare quindi una diluizione in serie aggiungendo 750 µl della diluizione precedente a 750 µl del tampone di prova per ottenere le concentrazioni finali di 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 e 50 ng/ml.

Preparazione dei campioni

Iniziare con una diluizione 1:300 (ad esempio, mescolare 1 µl di plasma con 299 µl di tampone di prova) o una diluizione 1:30 del plasma nel tampone di prova. Se si vogliono ottenere grandi quantità di VTG, possono essere necessarie diluizioni aggiuntive o maggiori. Cercare di mantenere il valore B/B_o entro l'intervallo degli standard. Per i campioni senza VTG apprezzabile, ad esempio maschi e femmine di controllo (che sono tutti immaturi), utilizzare la diluizione 1:30. I campioni meno diluiti possono indurre effetti di matrice indesiderati.

Si raccomanda inoltre di analizzare un campione di controllo positivo su ciascuna piastra. Tale controllo proviene da un pool di plasma contenente elevati livelli indotti di VTG. Il pool è inizialmente diluito in NGS, suddiviso in aliquote e conservato a -80 °C. Per ciascuna piastra, viene scongelata un'aliquota, ulteriormente diluita in tampone di prova ed analizzata come un campione di prova.

Incubazione con l'anticorpo primario

Preparare l'anticorpo primario diluendo 1:2000 del siero contenente l'anticorpo primario preassorbito nel tampone di prova (ad esempio, 8 µl - 16 ml di tampone di prova). Combinare 300 µl di soluzione contenente l'anticorpo primario con 300 µl di campione/standard in una provetta di vetro. Preparare la provetta di B_o seguendo la medesima procedura con 300 µl di tampone di prova e 300 µl di anticorpo. Inoltre, preparare una provetta NSB contenente unicamente 600 µl di tampone di prova (cioè senza anticorpi). Ricoprire le provette con Parafilm e agitare delicatamente nell'agitatore. Mantenere in incubazione a 37 °C in bagnomaria per 1 ora.

Lavaggio della piastra

Lavare la piastra appena prima del completamento dell'incubazione dell'anticorpo primario. A tal fine, scuotere la piastra per farne uscire il contenuto e asciugarla con carta assorbente. Poi riempire i pozzetti con 350 µl di soluzione di lavaggio, svuotare e asciugare tamponando. In questo caso sono utili una pipetta a ripetizione multicanale o un lavatore per micropiastre. La fase di lavaggio è ripetuta altre due volte per un totale di tre lavaggi.

Caricamento della piastra

Una volta lavata la piastra, estrarre le provette dal bagnomaria e agitare leggermente nell'agitatore. Aggiungere 200 µl da ciascuna provetta di campione, di standard, di B_o e di NSB per raddoppiare i pozzetti della piastra. Ricoprire la piastra con pellicola sigillante adesiva e lasciar incubare a temperatura di 37 °C per 1 ora.

Incubazione con l'anticorpo secondario

Al termine dell'incubazione della fase precedente, le piastre vanno nuovamente lavate tre volte, come sopra indicato. Preparare l'anticorpo secondario diluito mescolando 2,5 µl dell'anticorpo secondario con 50 ml di tampone di prova. Aggiungere 200 µl dell'anticorpo secondario diluito in ciascun pozzetto, sigillare come sopra indicato, e incubare per 1 ora alla temperatura di 37 °C.

Aggiunta di un substrato

Quando l'incubazione dell'anticorpo secondario è completata, lavare la piastra tre volte come descritto in precedenza. Successivamente, aggiungere 100 µl di substrato TMB in ciascun pozzetto. Lasciar reagire per 10 minuti, preferibilmente al riparo da fonti di luce brillante. Arrestare la reazione aggiungendo 100 µl di acido fosforico 1 M. Ciò modificherà il colore da blu a giallo intenso. Misurare l'assorbanza a 450 nm utilizzando un lettore di micropiastre.

Calcolare B/B_0

Sottrarre il valore medio NSB da tutte le misurazioni; il valore B/B_0 di ciascun campione e standard è calcolato dividendo il valore di assorbanza (B) per l'assorbanza media del campione B_0.

Generare una curva standard e determinare le quantità sconosciute

Generare una curva standard con l'ausilio di un software di grafica (ad esempio Slidewrite™ o Sigma Plot ®) che estrapolerà la quantità dalla B/B_0 del campione sulla base della B/B_0 delle soluzioni standard. Tipicamente, la quantità è rappresentata su una scala logaritmica e la curva è di forma sigmoide, che, tuttavia, può apparire lineare quando l'intervallo di standard utilizzato è ristretto. Correggere le quantità del campione per il fattore di diluizione e annotare in mg di VTG/ml di plasma.

Determinare i limiti minimi di rilevazione

Spesso, soprattutto negli esemplari maschi normali, non sarà chiaro come annotare i risultati ottenuti dai valori bassi. In questi casi, si utilizza un intervallo di confidenza al 95 % per determinare se il valore debba essere indicato come "zero" o un altro numero. Se il risultato del campione corrisponde all'intervallo di confidenza dello standard zero (B_0), il risultato deve essere registrato come zero. Il livello minimo di rilevazione sarà il livello più basso che è sistematicamente diverso dallo standard zero; ciò significa che i due intervalli di confidenza non si sovrappongono. Se il risultato di campionamento si situa all'interno o al di sopra del limite di confidenza del livello minimo di rilevazione, si registrerà il valore calcolato. Se un campione è compreso tra lo standard zero e gli intervalli di confidenza del limite minimo di rilevazione, si annota una metà del livello minimo di rilevazione per il valore di tale campione.

BIBLIOGRAFIA

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113-125.

Appendice 7

Analisi Statistica

Il LAGDA genera tre tipologie di dati che vanno analizzati statisticamente: 1) dati quantitativi continui; 2) dati relativi ai tempi che precedono le varie manifestazioni concernenti i ritmi di sviluppo (giorni fino al raggiungimento dello stadio NF62); e 3) dati ordinali sotto forma di indici di gravità relativi o di stadi di sviluppo, derivanti da valutazioni istopatologiche. L'albero decisionale raccomandato per l'analisi statistica per il LAGDA è illustrato nella figura 1. Di seguito sono riportate anche alcune annotazioni che potrebbero essere utili per effettuare tale analisi. Con riferimento all'albero decisionale, i valori ottenuti per la mortalità, la crescita (peso e lunghezza) e l'indice epatosomatico (LSI) devono essere analizzati conformemente al ramo «Altri endpoint».

Dati continui

Innanzitutto, si verifica se i dati per gli endpoint continui sono monotoni mediante trasformazione di rango dei dati, l'approssimazione a un modello ANOVA e il raffronto dei contrasti lineari e quadratici. Se i dati sono monotoni, occorre applicare un test di tendenza regressivo di Jonckheere-Terpstra alle mediane delle repliche senza effettuare alcun'altra analisi successiva. Un'alternativa per i dati normalmente distribuiti con varianze omogenee è il test regressivo di Williams. Se non sono monotoni (il contrasto quadrato è significativo e il contrasto lineare è non significativo), i dati devono essere analizzati utilizzando un modello ANOVA a effetti misti. I dati devono quindi essere valutati per verificare la normalità (preferibilmente con il test di Shapiro-Wilk o di Anderson-Darling) e l'omogeneità della varianza (preferibilmente con il test di Levene). Entrambi i test utilizzano i dati residui di un modello ANOVA a effetti misti. È possibile sostituire, previo giudizio di un esperto, tali test formali di normalità e omogeneità della varianza, ma questi ultimi sono comunque preferibili. Se i dati presentano una distribuzione normale e una varianza omogenea, i presupposti di un modello ANOVA a effetti misti sono soddisfatti e il test di Dunnett premette di determinare gli effetti significativi del trattamento. In caso di «non normalità» o di «eterogeneità della varianza» le ipotesi del test di Dunnett sono violate e si cerca di trasformare i dati per ottenerne la distribuzione normale e di stabilizzare la varianza. Se non si trova alcuna trasformazione di questo tipo, si determinano gli effetti significativi del trattamento con il test di Dunn. Se possibile, è opportuno effettuare un test unilaterale anziché bilaterale, ma è necessario il giudizio di un esperto per determinare quale test sia adeguato per un determinato endpoint.

Mortalità

I dati sulla mortalità dovrebbero essere analizzati per il periodo di tempo che comprende l'intera prova e dovrebbero essere espressi in percentuale dei decessi in una determinata vasca. I girini che non hanno completato la metamorfosi in un determinato periodo di tempo, i girini che fanno parte della coorte di sottocampioni di larve, le rane giovani che sono soppresse e tutti gli altri animali morti per errore sperimentale sono trattati come dati censurati e non inclusi nel denominatore del rapporto per il calcolo del valore percentuale. Prima di qualsiasi analisi statistica le proporzioni di mortalità sono trasformate per la radice quadrata dell'arcoseno. In alternativa si può utilizzare il test regressivo di Cochran-Armitage, eventualmente con correzione di tipo Rao-Scott in presenza di dispersione eccessiva.

Peso e lunghezza (dati relativi alla crescita)

I maschi e le femmine non sono dimorfici sessualmente durante la metamorfosi, pertanto i dati relativi alla crescita del sottocampione di larve dovrebbero essere analizzati indipendentemente dal sesso. Tuttavia, i dati relativi alla crescita delle rane allo stadio giovanile dovrebbero essere analizzati separatamente in funzione del sesso genetico. Può essere necessaria una trasformazione logaritmica per questi endpoint, in quanto non è raro che i dati relativi alla dimensione seguano una legge log-normale.

Indice epatosomatico (LSI)

I pesi del fegato devono essere normalizzati in funzione del peso del corpo intero (cioè, LSI) e analizzati separatamente in funzione del sesso genetico.

Tempo fino allo stadio NF62

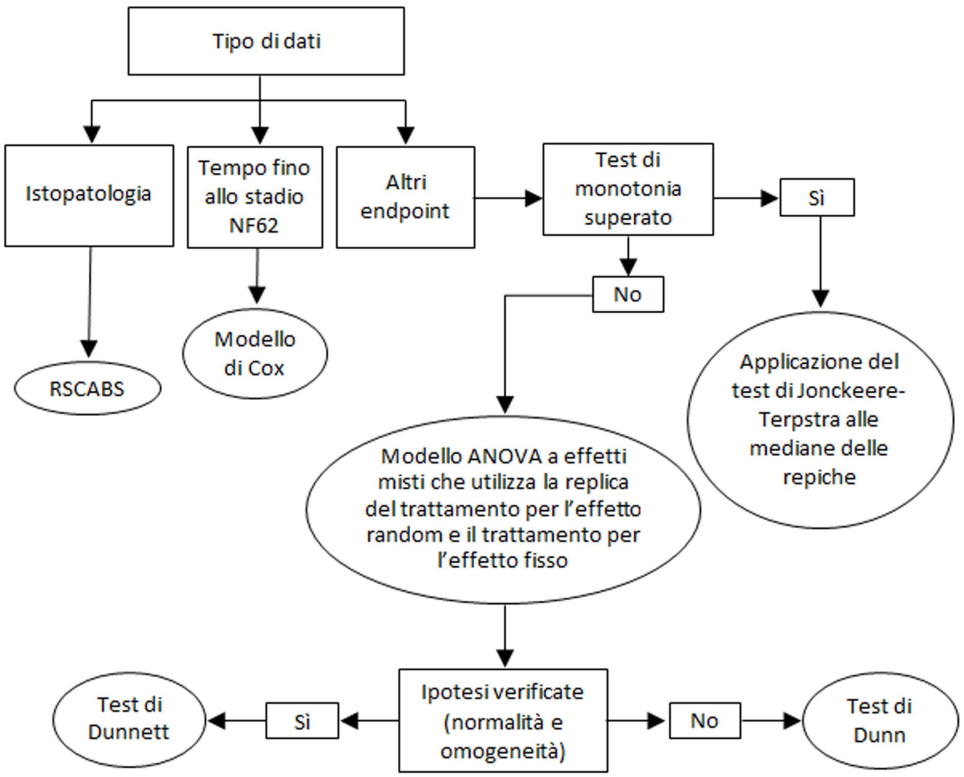
I dati relativi al tempo trascorso fino alla metamorfosi sono trattati come dati di tipo "time-to-event"; i decessi o individui che non raggiungono lo stadio NF62 in 70 giorni sono trattati come dati censurati a destra (ossia, il valore reale è superiore a 70 giorni, ma lo studio termina prima che gli animali abbiano raggiunto lo stadio NF62 in 70 giorni). Il tempo mediano fino allo stadio NF62, che corrisponde al completamento della metamorfosi, in controlli contenenti acqua di diluizione è utilizzato per determinare la data del completamento della prova. Il tempo mediano fino al completamento della metamorfosi potrebbe essere determinato mediante stimatori del prodotto-limite di Kapian-Meier. Questo endpoint dovrebbe essere analizzato utilizzando un modello a effetti misti a rischi proporzionati di Cox, che tiene conto della struttura delle repliche dello studio.

Dati istopatologici (indice di gravità e fasi di sviluppo)

I dati istopatologici sono costituiti da indici di gravità o fasi di sviluppo. Una prova denominata RSCABS (*Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices*) utilizza un test di tendenza Cochran-Armitage con correzione di Rao-Scott per ciascun livello di gravità in una risposta istopatologica (Green *et al.*, 2014). La correzione di tipo Rao-Scott permette di tenere conto del disegno sperimentale delle vasche di replica nella prova. La procedura RSCABS «*by Slices*» (per tranche) tiene conto dell'aspettativa biologica secondo la quale la gravità dell'effetto tende ad aumentare con l'aumento delle dosi o delle concentrazioni, pur conservando gli indici individuali e indicando la gravità di qualsiasi effetto riscontrato. La procedura RSCABS non si limita a determinare quali trattamenti sono statisticamente diversi dai controlli (ossia, presentano una patologia più grave rispetto ai controlli), ma permette di determinare anche a quale indice di gravità tale effetto appare, e quindi di collocare l'analisi in un contesto fortemente necessario. Per determinare gli stadi di sviluppo delle gonadi e dei dotti riproduttivi, occorre sottoporre i dati a un'ulteriore manipolazione, in quanto un'ipotesi del test RSCABS è che la gravità degli effetti aumenta con la dose. L'effetto osservato potrebbe corrispondere a un ritardo o un'accelerazione dello sviluppo. È pertanto opportuno analizzare i dati sugli stadi di sviluppo come indicato al fine di individuare un'accelerazione nello sviluppo e quindi invertirli manualmente prima di effettuare una seconda analisi per individuare un eventuale ritardo nello sviluppo.

Figura 1

Albero decisionale per l'analisi statistica dei dati del LAGDA



BIBLIOGRAFIA

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry, 33, 1 108-1 116.

Appendice 8

CONSIDERAZIONI DI CUI TENER CONTO PER MONITORARE E RIDURRE AL MINIMO LA FREQUENZA DELLA SCOLIOSI

La scoliosi idiopatica, che di solito si manifesta come una «coda piegata» nei girini della specie *Xenopus laevis*, può complicare le osservazioni morfologiche e comportamentali nelle popolazioni di prova. Occorre adoperarsi per ridurre al minimo o eliminare l'incidenza della scoliosi, sia negli animali che nelle condizioni sperimentali. Nella prova definitiva si raccomanda che l'incidenza della scoliosi moderata e grave sia inferiore al 10 %, per aumentare la fiducia nella capacità della prova di individuare gli effetti sullo sviluppo correlati al trattamento in larve di anfibi altrimenti in buona salute.

Le osservazioni giornaliere durante la prova definitiva devono registrare sia l'incidenza (conteggio individuale) sia la gravità della scoliosi, se presente. La natura dell'anomalia va descritta con riferimento alla localizzazione (ad esempio, anteriore o posteriore alla cloaca) e la direzione della curvatura (ad esempio, laterale o dorso-ventrale). La gravità può essere classificata come segue:

(NR) Non significativa: nessuna curvatura presente

(1) Minima: leggera curvatura laterale posteriore alla cloaca; apparente solo a riposo

(2) Moderata: curvatura laterale posteriore alla cloaca; visibile in qualsiasi momento ma non inibisce il movimento

(3) Grave: curvatura laterale anteriore alla cloaca; OPPURE qualsiasi curvatura che impedisca il movimento; OPPURE qualsiasi curvatura dorso-ventrale

Un gruppo consultivo scientifico dell'Agenzia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti (US EPA) per le norme FIFRA (FIFRA SAP 2013) ha esaminato i dati sintetici relativi alla scoliosi nell'ambito di quindici saggi di metamorfosi degli anfibi sulla specie *X. laevis* (stadi 51-60+) e ha formulato raccomandazioni generali per ridurre la prevalenza di questa anomalia nelle popolazioni sperimentali. Le raccomandazioni sono pertinenti per il LAGDA, anche se questa prova implica un calendario di sviluppo più lungo.

Dati storici relativi alla deposizione delle uova

In generale, adulti sani e di qualità superiore dovrebbero essere utilizzati come coppie riproduttrici; l'eliminazione di coppie riproduttrici che generano prole con scoliosi può ridurne al minimo l'apparizione di tale patologia nel corso del tempo. In particolare, può essere utile ridurre al minimo il ricorso a riproduttori catturati allo stato selvatico. Il periodo di esposizione del LAGDA inizia con gli embrioni dello stadio NF8-10 e non è possibile determinare all'inizio della prova se determinati individui manifesteranno una scoliosi. Pertanto, oltre al monitoraggio dell'incidenza della scoliosi negli animali sottoposti a prova, è opportuno documentare i dati storici relativi alla deposizione delle uova (compresa la prevalenza della scoliosi nelle larve autorizzate a svilupparsi). Può essere utile monitorare ulteriormente la porzione delle uova deposte non utilizzata in un determinato studio e rendere conto di tali osservazioni (FIFRA SAP 2013).

Qualità dell'acqua

È importante garantire un'adeguata qualità dell'acqua, sia nello stock di laboratorio che durante la prova. Oltre ai criteri di qualità dell'acqua periodicamente valutata ai fini della tossicità, può essere utile monitorare le eventuali carenze nutrizionali e correggerle (*e.g.*, carenza di vitamina C, calcio, fosforo) o livelli eccessi di selenio e rame, che sono indicati come elementi che possono indurre la scoliosi a livelli variabili nelle specie *Rana* e *Xenopus* allevate in laboratorio. (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; come indicato in FIFRA SAP 2013). L'applicazione di un regime alimentare adeguato (cfr. appendice 4) e la pulizia regolare delle vasche migliorano in generale la qualità dell'acqua e la salute degli organismi sperimentali.

Alimentazione

Le raccomandazioni specifiche in materia di regime alimentare, risultate efficaci nel LAGDA, sono descritte in dettaglio nell'appendice 4. Si raccomanda di controllare la presenza, nelle fonti dei mangimi, di tossine biologiche, erbicidi e altri pesticidi che sono notoriamente causa di scoliosi in *X. laevis* o altri animali acquatici (Schlenk e Jenkins 2013). Ad esempio, l'esposizione ad alcuni inibitori della colinesterasi è stata associata alla scoliosi nei pesci (Schultz *et al.* 1985) e nelle rane (Bacchetta *et al.* 2008).

BIBLIOGRAFIA

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. Science of the Total Environment 392: 110 — 118

Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. Toxicology 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. Journal of the World Aquaculture Society 13: 322-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraez, and P. Herraez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314-320.

Schlenk, D., and Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. May 21-23, 2013. Washington, DC."